

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Dietrich von Schweinitz

Die Rolle von *Kindlin1* bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Kindesalter

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Johanna Althans (geb. Helmbrecht)
aus
Regensburg
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler
Mitberichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Florian Beigel Priv.-Doz. Dr. Fabian Schnitzler
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. Martin Lacher
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	22.10.2018

Manchmal brauchen wir ein bisschen Zeit, um zu verstehen
oder sind wir nur noch nicht bereit, den Weg zu gehen.

G. Meyle

1	Einleitung	4
1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	4
1.1.1	Epidemiologie der CED	5
1.1.2	Ätiologie der CED	6
1.2	Kindlin Proteine	8
1.2.1	Kindlin Proteine in der fokalen Zelladhäsion	9
1.2.2	Inaktivierende <i>Kindlin1</i> -Mutationen und gestörte Gewebsintegrität	12
1.3	Gastrointestinale Symptome im Zusammenhang mit <i>Kindlin1</i> -Mutationen	12
1.3.1	Auftreten von gastrointestinalen Symptomen bei Kindler-Syndrom-Patienten	12
1.3.2	Auftreten einer Colitis bei homozygoten <i>Kindlin1</i> -Knockout-Mäusen	13
1.4	Chemisch induzierte Colitis durch Natriumdextransulfat im Mausmodell	13
2	Zielsetzung und Arbeitshypothese	15
3	Material	16
3.1	Geräte	16
3.2	Software	18
3.3	Verbrauchsmaterialien	18
3.4	Chemikalien und Reagenzien	19
3.5	Puffer und Lösungen	21
3.6	Kulturmedien	22
3.7	Eukaryotische Zelllinien	23
3.8	Kits	23
3.9	Größenstandards	24
3.10	Enzyme	24
3.11	Primer	24
3.11.1	Humane <i>real-time</i> PCR Primer	24
3.11.2	Murine <i>real-time</i> PCR Primer	25
3.11.3	Murine Genotypisierungsprimer	25
3.12	Antikörper	25
3.12.1	Primärantikörper	25
3.12.2	Sekundärantikörper	26
3.13	siRNA	26
4	Methoden	27
4.1	Zellbiologische Methoden	27
4.1.1	Kultivieren und Passagieren eukaryotischer Zelllinien	27
4.1.2	Knockdown von <i>Kindlin1</i> durch siRNA-Transfektion in HT29 Zellen	27

4.2	Gewinnung des humanen Probenmaterials	27
4.2.1	Patientengruppe	28
4.2.2	Kontrollgruppe	29
4.2.3	Biopsierung	29
4.2.4	Mukosapräparation	29
4.3	Tierexperimentelle Arbeiten	30
4.3.1	Heterozygote <i>Kindlin1</i> -Knockout-Maus	30
4.3.2	Wildtyp-Maus	30
4.3.3	Natriumdextransulfat-Colitis-Mausmodell	30
4.3.4	Klinisches Monitoring	31
4.4	Konservierung der murinen Gewebeproben	32
4.4.1	Paraffineinbettung von Gewebe	32
4.5	Molekularbiologische Methoden	32
4.5.1	Isolation von DNA aus Gewebe	32
4.5.2	Genotypisierung der Versuchstiere	33
4.5.3	RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellen und Gewebe	33
4.5.4	DNase-Verdau	34
4.5.5	cDNA-Synthese	35
4.5.6	Quantitative <i>real-time</i> PCR	36
4.6	Proteinbiochemische Methoden	36
4.6.1	Proteinisolation aus adhärenenten Zellen und Gewebe	36
4.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford	36
4.6.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
4.7	Immunologische Methoden	37
4.7.1	Western Blot	37
4.8	Histologische Färbungen	38
4.8.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	38
4.8.2	<i>Periodic acid-Schiff</i> -Reaktion	38
4.8.3	Schema zur Auswertung der Gewebeschnitte	38
4.9	Statistische Methoden	39
5	Ergebnisteil I: Genexpressionsanalysen in Darmbiopsien kindlicher CED-Patienten und im Zellkulturmodell	40
5.1	Expression von <i>Kindlin1</i> , <i>Talin</i> , <i>Paxillin</i> und <i>Integrin beta1</i> in der Kolonmukosa kindlicher CED-Patienten	40

5.2	Funktioneller Zusammenhang der Genexpression von <i>Kindlin1</i> und der seiner Interaktionspartner im Zellkulturmodell	43
6	Ergebnisteil II: Tierexperimenteller Ansatz zur Untersuchung des Einflusses der Gendosis von <i>Kindlin1</i> auf das Colitisrisiko	46
6.1	Genexpression von <i>Kindlin1</i> , <i>Talin</i> , <i>Paxillin</i> und <i>Integrin beta1</i> in <i>Kindlin1</i> ^{+/-} -Mäusen	46
6.2	Auswertung des Natriumdextransulfat-Colitis-Mausmodells	48
6.2.1	Klinisches Monitoring Teil 1: Auftreten von okkultem sowie sichtbarem Blut im Stuhl der Versuchstiere	48
6.2.2	Klinisches Monitoring Teil 2: Gewichtsverlust	49
6.2.3	Klinisches Monitoring Teil 3: Veränderung der Kolonlänge	49
6.2.4	Histologische Veränderungen der Darmwand im Rektum	50
6.2.5	Untersuchung der Mukosaveränderungen auf Proteinebene	53
6.2.6	Überprüfung des Entzündungsstatus der Versuchstiere auf molekularbiologischer Ebene	53
6.3	Molekularbiologische Untersuchung eines möglichen Feedbackmechanismus der induzierten Colitis auf die Expression von <i>Kindlin1</i> , <i>Talin</i> , <i>Paxillin</i> und <i>Integrin beta1</i>	54
7	Diskussion	56
7.1	Veränderte Genexpression der fokalen Adhäsionsproteine bei kindlichen CED-Patienten	56
7.2	Klinische und histologische Untersuchungen zeigen keine Unterschiede zwischen <i>Kindlin1</i> ^{+/-} -Mäusen und Wildtyp-Mäusen mit Natriumdextransulfat-induzierter Colitis	58
7.3	Genexpressionsanalysen geben Hinweis auf gleiche Colitis-Suszeptibilität der beiden Versuchstiergruppen	59
7.4	Reduktion der <i>Kindlin1</i> -Expression im murinen Tiermodell bei akuter Entzündung	60
7.5	Hinweise auf mögliche adhäsionsunabhängige Kindlin1-Funktionen bei der Natriumdextransulfat-induzierten Colitis im Mausmodell	61
7.6	Erhöhte intestinale Apoptoserate nach Colitis-Induktion im Mausmodell	62
7.7	Experimenteller Ausblick	63
8	Zusammenfassung	64
9	Abkürzungsverzeichnis	66
10	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	68
11	Literaturverzeichnis	70
12	Lebenslauf	79
13	Anhang	81
13.1	Versuchsbogen für das tägliche klinische Monitoring im DSS-Colitis-Mausmodell	81
14	Danksagung	82

1 Einleitung

Der Darm stellt die größte Grenzfläche des menschlichen Körpers zu unserer Umwelt dar. Neben der Nährstoff- und Flüssigkeitsresorption besteht seine Aufgabe auch in der Abwehr ebenso wie in der Toleranz von Mikroorganismen und Antigenen sowie der Signalweiterleitung. Diese Aufgaben können nur durch ein komplexes Zusammenspiel von intestinalen Strukturen und Immunfunktionen gewährleistet werden, wozu auch ständige physiologische, sich selbst begrenzende Entzündungsprozesse gehören. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann jedoch zu pathologischen Veränderungen einzelner Darmregionen oder des gesamten Magen-Darm-Trakts führen (BEHRENS 2006; BUDARF ET AL. 2009; HALLER 2012).

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) zählt man die Colitis Ulcerosa (CU), den Morbus Crohn (MC) und die Colitis Indeterminata (CI). Bei letztgenannter, seltener Form der CED kann keine eindeutige Zuordnung zu MC oder CU getroffen werden. Bei all diesen Erkrankungen handelt es sich um chronisch wiederkehrende Entzündungen des Gastrointestinaltrakts (GEBODES ET AL. 2003; HOFFMANN 2009; JAGER ET AL. 2013).

In der Geschichte der Medizin finden sich immer wieder Fallbeschreibungen, die auf eine CED hindeuten. Sie konnten jedoch lange Zeit nicht von infektiösen Darmerkrankungen unterschieden werden (HOFFMANN 2009). Erst im Jahr 1932 legte der Gastroenterologe Burrill Crohn mit der Veröffentlichung „*Regional ileitis - a pathologic and clinical entity*“ die Leitsymptome der „Nicht-tuberkulösen Ileitis terminalis“ fest, die eigentlich erstmals von Leśniowski beschrieben worden waren (CROHN ET AL. 1984; LICHTAROWICZ ET AL. 1988; BARTNIK 2003). Später wurde dieses Krankheitsbild, aufgrund der Erkenntnis, dass der gesamte Magen-Darm-Trakt und nicht nur das terminale Ileum befallen sein kann, nach dem Erstautor der genannten Veröffentlichung in Morbus Crohn umbenannt (HOFFMANN 2009). Die CU wurde erstmals detaillierter von Wilks und Kollegen beschrieben (WILKS 1859). Lockhart-Mummery und Morson veröffentlichten 1960 eine Arbeit, die maßgeblich zur besseren Unterscheidung von MC und CU beitrug (LOCKHART-MUMMERY ET AL. 1960; CROHN ET AL. 1984; HOFFMANN 2009). Die CU ist definiert durch eine sich kontinuierlich ausbreitende Entzündung, die ausschließlich die oberflächlichen Schleimhautschichten des Kolons betrifft (BOUSVAROS ET AL. 2007). Sie breitet sich vom Rektum her auf die proximal gelegenen Kolonregionen aus. Beim MC hingegen handelt es sich um diskontinuierlich, segmental

auftretende Entzündungen des gesamten Magen-Darm-Trakts, die auch tiefere Wandschichten betreffen. Am häufigsten sind hier die Entzündungen im terminalen Ileum und dem proximalen Kolon lokalisiert (Abbildung 1-1) (BOUSVAROS ET AL. 2007).

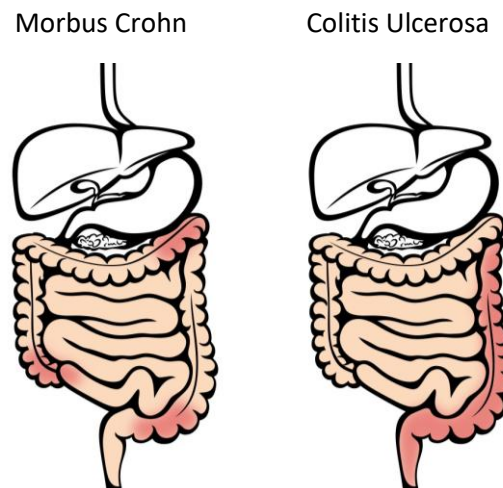


Abbildung 1-1: Diskontinuierlich segmentale Entzündung aller Wandschichten bei MC (links) im Vergleich zur von distal her kontinuierlich verlaufenden und auf das Kolon begrenzten Entzündung der luminalen Wandschichten bei der CU (rechts) (nach <https://crohnsdisease.com/ulcerative-colitis/>; Stand 31.1.2017)

1.1.1 Epidemiologie der CED

Epidemiologische Daten zu CED variieren nicht nur zwischen verschiedenen Regionen, sondern auch innerhalb dieser sehr stark. Jedoch ist sowohl in Deutschland als auch in Gesamteuropa ein deutlicher Anstieg von Inzidenz und Prävalenz der Erkrankungen CU und MC zu verzeichnen. Die jährliche Inzidenz von MC liegt in Deutschland aktuell bei etwa 4-6 / 100.000 Einwohner, die von CU bei etwa 3-7 / 100.000 Einwohner (MOLODECKY ET AL. 2012).

25-30 % der MC und 20 % der CU-Diagnosen manifestieren sich bereits im Kindes- und Jugendalter, also vor dem 21. Lebensjahr (KELSEN ET AL. 2008). Die geschätzte Zahl der Neuerkrankungen unter 16 Jahren liegt in Deutschland bei etwa 800 Kindern und Jugendlichen jährlich (SCHWEINITZ 2009). Gerade im Kindesalter gestaltet sich die Diagnosestellung häufig schwierig, da das Leitsymptom chronisch rezidivierende Bauchschmerzen auch bei 10-15 % der Schulkinder, die nicht an einer CED leiden, auftritt. Der Verdacht auf MC wird durch die Symptomtrias chronisch wiederkehrende

Bauchschmerzen (84 %), Gewichtsverlust oder -stillstand (80 %) und chronische Durchfälle (79 %) erhärtet (APLEY ET AL. 1958; BEHRENS 2006; HOFFMANN 2009).

1.1.2 Ätiologie der CED

Die genaue Ätiologie der CED ist noch unklar. Es gibt verschiedene Hypothesen, wobei davon auszugehen ist, dass nicht nur das Auftreten eines Risikofaktors, sondern vielmehr die Summierung mehrerer Faktoren erst zur Manifestation einer CED führt. In der Literatur werden fünf Hauptrisikogruppen beschrieben: Umweltfaktoren, Lebensstil, Veränderungen der intestinalen Mikroflora, immunologische Faktoren und genetische Prädisposition (KUCHARZIK ET AL. 2006; SCHIRBEL ET AL. 2010; LATELLA ET AL. 2012).

Da für diese Arbeit primär die genetische Prädisposition sowie die Rolle der intestinalen Barriere in Zusammenhang mit dem Auftreten einer CED im Kindesalter von Relevanz ist, wird auf die weiteren genannten Risikofaktoren im Folgenden nicht genauer eingegangen.

1.1.2.1 Genetische Prädisposition für CED

Das gehäufte familiäre Auftreten von CED speziell bei eineiigen Zwillingen unterstreicht die These, dass die genetische Prädisposition ein wichtiger Risikofaktor für eine CED ist (ORHOLM ET AL. 2000; HALFVARSON ET AL. 2003; HALME ET AL. 2006; BRANT 2011). Gerade bei sehr frühem Auftreten einer CED scheinen genetische Faktoren eine besondere Rolle zu spielen und Umweltfaktoren sowie Lebensstil noch von geringerer Bedeutung zu sein (LODDO ET AL. 2015). Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Reihe von Genen beziehungsweise Genmutationen und Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms* (SNPs)) beschrieben, die mit einer CED im Kindesalter assoziiert sind (LACHER ET AL. 2007). Hauptsächlich betreffen diese Mutationen Gene, welche im Zusammenhang mit der epithelialen Abwehr und der Barrierefunktion des Darmes sowie der Steuerung von Mechanismen der adaptiven Immunantwort stehen (HOFFMANN 2009). Hierzu gehören Mutationen und SNPs in den Genen *IL10* (GLOCKER ET AL. 2009) und *IL10R* (GLOCKER ET AL. 2010; MORAN ET AL. 2013), ebenso wie *CXCL9* (LACHER ET AL. 2007), *ATG16L1* (LACHER ET AL. 2009), *IL23* (LACHER ET AL. 2010) und *NOD/CARD15*, wobei bei zuletzt genanntem vor allem die p.1007fs Variation mit einer CED-Manifestation im Kindesalter assoziiert ist (LACHER ET AL. 2010; MORAN ET AL. 2013).

1.1.2.2 Die intestinale Barriere

Die Aufgabe des Darmepithels besteht neben der Absorption von Flüssigkeit, Nährstoffen und Ionen sowie der Sekretion auch darin, den Körper vor pathogenen Mikroorganismen und Antigenen zu schützen (selektive intestinale Barriere) (HOFFMANN 2009).

Die erste Schutzschicht stellt der Mukus dar. Sekretiert von den Becherzellen, die im Epithelverband integriert sind, trennt der Mukus die intestinale Epithelschicht selektiv bis vollständig vom Darmlumen, im Bereich des Kolons auch von der intestinalen Mikroflora (CORAZZIARI 2009; JAGER ET AL. 2013). Vor allem CED-Patienten mit der Diagnose CU weisen häufig im Bereich des Kolons eine dünnere Schleimschicht auf (PULLAN ET AL. 1994). Durch eine verminderte Becherzellzahl sowie eine veränderte Mukusqualität kann es so zu vermehrtem Kontakt von sowohl Mikroorganismen der Darmflora als auch pathogenen Mikroorganismen aus der Nahrung und Umwelt mit dem intestinalen Epithel kommen (SHAOUL ET AL. 2004).

Dieses intestinale Epithel bildet die epitheliale Barriere, die durch einen engen Verband der Epithelzellen gewährleistet wird. Apikal gelegen finden sich zunächst die *tight junctions* (TJ). Als eng mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbundene Proteinkomplexe verhindern sie eine parazelluläre Passage von Makromolekülen und sind somit im Wesentlichen für die semipermeable Barriere zwischen Darmlumen und intestinalem Gewebe verantwortlich (BRUEWER ET AL. 2006; HOFFMANN 2009). Veränderungen in der Struktur der TJ zeigen sich sowohl bei MC als auch bei CU. So ist eine reduzierte Komplexität, eine geringere Anzahl von TJ-Strängen und das Auftreten von Diskontinuitäten bei CED beschrieben (SCHULZKE ET AL. 2009). Weiter basal liegen die *adherens junctions* (AJ). Bestehend aus E-Cadherin und zytoplasmatischen Proteinen sind diese Proteinkomplexe ebenfalls mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Die Aufgabe der AJ ist die Zellerkennung sowie die Initiierung und der Erhalt von Zell-Zell-Verbindungen (BRUEWER ET AL. 2006; HOFFMANN 2009).

Trotz dieser engen Zell-Zell-Verbindungen finden die meisten Transportvorgänge parazellulär mit Hilfe von Transportsystemen statt (HOFFMANN 2009). Doch auch diese ermöglichen keine Passage von Makromolekülen, partikulären Antigenen und Mikroorganismen. Eine Ausnahme stellen die M-Zellen mit den darunter liegenden Peyer-Plaques dar. Diese spezialisierten Epithelzellen transportieren Antigene zu den lymphatischen Geweben der intestinalen Mukosa (NEUTRA ET AL. 2001). Auf diese Weise wird das Immunsystem mit Informationen über das Darmmilieu versorgt (CASTRO-SANCHEZ ET AL. 2013). Zugleich kann

diese Passage aber auch von pathogenen Keimen genutzt werden, um die epitheliale Barriere zu überwinden (HOFFMANN 2009). Für die Integrität der epithelialen Barriere spielen jedoch nicht nur die oben genannten Zell-Zell-Verbindungen, sondern auch Zell-Matrix-Verbindungen, sprich die fokale Zelladhäsion, eine Rolle, wie im Weiteren näher beschrieben wird (siehe 1.2.1.) (ANAND ET AL. 2007).

1.2 Kindlin Proteine

Ein zu den fokalen Zelladhäsionsproteinen gehörendes Protein ist Kindlin1. Theresa Kindler beschrieb 1954 den Fall einer 14-jährigen Patientin, die an einer Hauterkrankung mit Symptomen sowohl der Epidermolysis bullosa hereditaria als auch der angeborenen Poikilodermie litt. Die Krankheit des Mädchens zeichnete sich unter anderem durch dünne, pergamentartige Haut, Atrophie, Blasenbildung und Photosensibilität der betroffenen Hautareale aus (KINDLER 1954). Dieses, später nach Theresa Kindler benannte, Kindler-Syndrom (KS) ist eine autosomal rezessive Erkrankung. Wie Anfang dieses Jahrtausends bekannt wurde, ist sie auf eine homozygote Mutation des *fermitin family member 1* (*FERMT1*), auch *Kindlin1* Gen genannt, zurückzuführen (JOBARD ET AL. 2003; SIEGEL ET AL. 2003; FINE ET AL. 2008). Das 48.700 Basenpaar (bp) große Gen liegt auf dem chromosomalen Abschnitt 20p12.1. Es besteht aus 15 Exons mit dem Start-Codon in Exon 2 und dem Stopp-Codon in Exon 15 und kodiert das fokale Zelladhäsions- und Phosphoprotein Kindlin1 (SIEGEL ET AL. 2003). Alle 46 bislang identifizierten Mutationen führen zu einem Translationsabbruch und zu einem Verlust der Proteinfunktion (LAI-CHEONG ET AL. 2010; TECHANUKUL ET AL. 2011).

Die Kindlin Proteinfamilie besteht aus drei Mitgliedern: Kindlin1 oder *FERMT1*, Kindlin2 oder *FERMT2*, auch bekannt geworden als mitogene-inducible-gene-2-Protein (MIG-2), und Kindlin3 oder MIG-2B beziehungsweise *FERMT3* (WICK ET AL. 1994; WEINSTEIN ET AL. 2003). Die drei bislang bekannten Kindlin-Proteine werden von verschiedenen Genen kodiert, weisen aber in ihren Aminosäuresequenzen eine große Ähnlichkeit auf. Die Aminosäuresequenzen von Kindlin1 und Kindlin2 sind zu 65 % identisch, Kindlin1 und Kindlin3 sind zu 57 % homolog (KLOEKER ET AL. 2004; LARJAVA ET AL. 2008). Ihre Expression ist jedoch unterschiedlich lokalisiert. Kindlin1 ist epithelspezifisch und wird hauptsächlich in basalen Keratinozyten der Haut, intestinalen Epithelzellen und im Parodontalgewebe exprimiert, während Kindlin2 ubiquitär in soliden Geweben mit mesenchymalem Ursprung und Kindlin3 in den Zellen des

hämatopoetischen Systems exprimiert wird (SIEGEL ET AL. 2003; HERZ ET AL. 2006; USSAR ET AL. 2006; KERN ET AL. 2007; PETRICCA ET AL. 2009; MALININ ET AL. 2010).

1.2.1 Kindlin Proteine in der fokalen Zelladhäsion

Erstmals wurde im Jahr 1971 über die fokale Zelladhäsion berichtet (Lo 2006). Die Arbeitsgruppe um Abercrombie beschrieb sie als elektronendichte Regionen der Plasmamembran von Kulturzellen, die engen Kontakt mit dem Substrat, also der extrazellulären Matrix, herstellen (ABERCROMBIE ET AL. 1971). Fokale Zelladhäsionskomplexe bilden in Geweben keine unter dem Elektronenmikroskop sichtbar markanten Strukturen, wie beispielsweise *gap junctions*, TJs oder Desmosomen. Daher wurde zunächst vermutet, dass sie lediglich in Zellkulturen vorkommen. Mit Hilfe von immunoelektronenmikroskopischer Visualisierung des fokalen Zelladhäsionsproteins Tensin konnte ihr Vorkommen jedoch in Zell-Matrixverbindungen *in vivo* nachgewiesen werden (FUCHS ET AL. 1997; Lo 2006).

Die Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix ist beteiligt an der Gewährleistung der Integrität und Funktion von Geweben (LARIJAVA ET AL. 2008). Es wird neben der mechanischen Verankerung der Zelle in ihrer extrazellulären Matrix auch eine physikalische Verbindung zu ihrer Umwelt hergestellt. Informationen über Anlagerung, Migration, Proliferation, Differenzierung, Genexpression und Zelltod können so ausgetauscht beziehungsweise vermittelt werden (HYNES 1987; HYNES 2002; Lo 2006).

Kernstück der fokalen Zelladhäsionskomplexe sind $\alpha\beta$ -Integrin-Heterodimere. Die extrazelluläre Untereinheit dieser Transmembranproteine ist in der Lage, an die extrazelluläre Matrix zu binden (JOCKUSCH ET AL. 1995; SCHWARTZ ET AL. 1995; HYNES 2002). Sie kann in verschiedenen Konformations- und dementsprechend unterschiedlichen Aktivitätszuständen (inaktiv, aktiv und ligandgebunden) vorliegen, welche sowohl Einfluss auf die strukturelle als auch auf die signalgebende Funktion der fokalen Zelladhäsion haben (ASKARI ET AL. 2010). Integrine verfügen jedoch weder über enzymatische noch über Aktin-bindende Eigenschaften. Deshalb werden alle strukturellen sowie signalgebenden Ereignisse von Proteinen vermittelt, welche mit der zytoplasmatischen Untereinheit der Integrine assoziieren und einen Multiproteinkomplex um diese bilden (Lo 2006).

Es wurden bislang mehr als 50 verschiedene Zelladhäsionsproteine beschrieben, was auf die Komplexität und den Umfang der fokalen Zelladhäsion schließen lässt (Lo 2006). Einige

dieser Proteine stehen primär mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung, andere assoziieren mit Signalproteinen wie Proteinkinasen, Phosphatasen oder anderen Adapterproteinen und deren Substraten (PETIT ET AL. 2000).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Rolle der Kindlin-Proteine als fokale Zelladhäsionsproteine, im Speziellen auf Kindlin1 und einige seiner direkten Interaktionspartner.

Kindlin-Proteine sind hauptsächlich intrazellulär in den fokalen Zelladhäsions-Multiproteinkomplexen zu finden (Abbildung 1-2), können aber auch in subzellulären Regionen lokalisiert sein (LARJAVA ET AL. 2008; MEVES ET AL. 2009). Die Kindlin-Familie gehört, wie auch ihr Interaktionspartner Talin, zur Gruppe der FERM-Proteine (4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin-Domäne) (WEINSTEIN ET AL. 2003). So besteht auch eine mehr als 50 %-ige Homologie zur FERM-Domäne des als essentiell für die Integrin-Aktivierung bekannten Talin (KLOEKER ET AL. 2004; SHI ET AL. 2007). Anders als bei Talin liegt die FERM-Domäne bei Kindlin1 aber nicht in der N-terminalen Region, sondern am Carboxylende und ist von einer Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) unterbrochen (LO 2006; GOULT ET AL. 2009). Mit der F3-Untereinheit dieser FERM-Domäne kann Kindlin1 direkt an die β 1-, β 2-, β 3- und β 6-Untereinheit der Integrine binden (KLOEKER ET AL. 2004; MEVES ET AL. 2009; BANDYOPADHYAY ET AL. 2012). Über diese Bindung kann Kindlin1 Einfluss auf die Konformation der extrazellulären Integrin-Untereinheit und somit auf Integrin-Aktivierung und Affinität zu extrazellulären Bindungspartnern nehmen.

Im inaktiven Zustand ist die Integrin- β -Einheit an die ebenfalls intrazelluläre Integrin- α -Untereinheit angelagert. Eine Trennung der beiden Untereinheiten durch die Bindung von Talin und Kindlin1 an die β -Untereinheit führt zur Aktivierung der extrazellulären Domäne, wodurch ihre Affinität zu extrazellulären Bindungspartnern, wie Proteinen der extrazellulären Matrix, steigt (Abbildung 1-2). Man spricht hier auch von *inside-out-signaling* (O'TOOLE ET AL. 1994; HUGHES ET AL. 1996; LIDDINGTON ET AL. 2002; CAMPBELL ET AL. 2004; BANNO ET AL. 2008; MOSER ET AL. 2009; KARAKOSE ET AL. 2010). Die Synergie beider Proteine, Kindlin und Talin, als Integrin-Bindungspartner scheint für dieses *inside-out-signaling* notwendig zu sein (LARJAVA ET AL. 2008; MALININ ET AL. 2010).

Die Liganden können ihrerseits auch Signale über die Integrine ins Zellinnere weitergeben (*outside-in-signaling*). Da Integrine jedoch nicht über enzymatische Aktivität verfügen, sind für die Signalübertragung wiederum Adapter- und Signalproteine nötig (BOTTCHE ET AL. 2009).

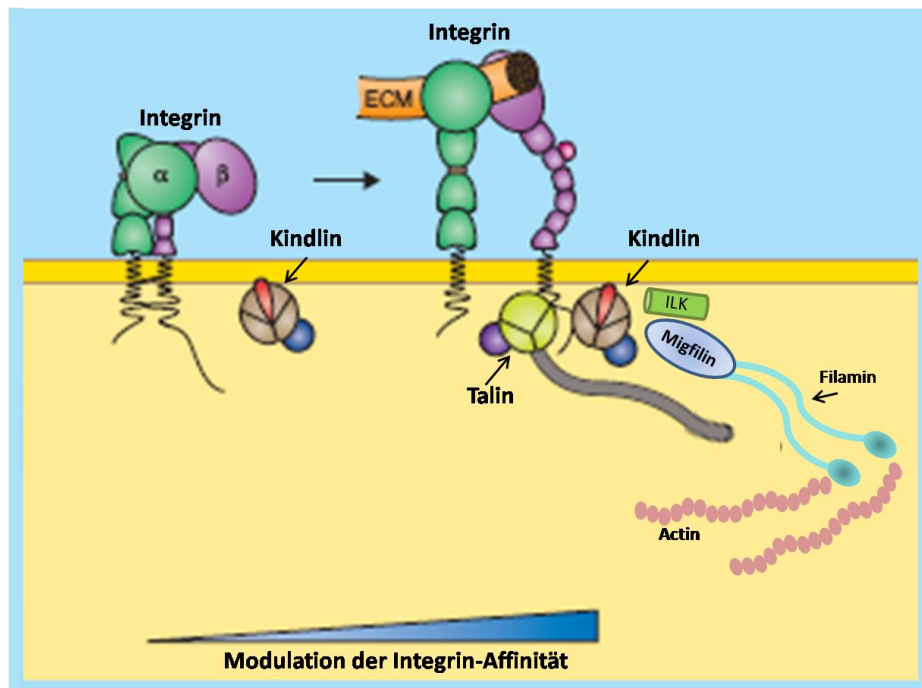


Abbildung 1-2: Integrin-Aktivierung durch Kindlin und Talin

Sowohl Kindlin1 als auch Talin1 binden intrazellulär an die β -Untereinheit des Transmembranproteins Integrin. Über die Bindung von Kindlin1 und Talin1 werden die im inaktiven Zustand verbundenen Integrin- α - und Integrin- β -Untereinheiten getrennt und somit ihre Affinität zu extrazellulären Liganden erhöht (nach KARAKOSE ET AL. 2010).

Kindlin1 ist als solches Adapterprotein auch in der Lage, über seine N-terminale Region eine Verbindung zu Migfilin herzustellen (TU ET AL. 2003; WU 2005). Migfilin bindet wiederum an Filamin, welches eine Verbindung zum Aktinzytoskelett der Zelle herstellen kann (ZHANG ET AL. 2006; MALININ ET AL. 2010). So wird zum einen eine Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett hergestellt, zum anderen führt die Bindung von Migfilin an Filamin zu einer verbesserten Talin-Integrin-Interaktion und nimmt somit wiederum Einfluss auf die Integrin-Aktivierung (BOTTCHER ET AL. 2009; ITHYCHANDA ET AL. 2009). Auch die fokale Adhäsionskinase (FAK) und die Integrin-linked-kinase (ILK) stellen Bindungspartner der N-terminalen Kindlin1-Region dar (HAS ET AL. 2009; LAI-CHEONG ET AL. 2009). Die ILK assoziiert wiederum mit verschiedenen Proteinen, darunter auch das Kinase-Domäne-tragende Protein Paxillin (BOTTCHER ET AL. 2009). Dieses Adapterprotein trägt zahlreiche Domänen, mit denen es zwischen Plasmamembran und Zytoskelett vermitteln kann und so eine Plattform für die Weiterleitung von Adhäsions- und Wachstumssignalen bietet (TURNER 2000).

1.2.2 Inaktivierende *Kindlin1*-Mutationen und gestörte Gewebsintegrität

Die wichtige Rolle der Kindlin-Familie bei der Gewebsintegrität und Barrierefunktion von Epithelien wird sowohl bei Erkrankungen deutlich, denen inaktivierende Mutationen der verschiedenen *Kindlin*-Gene zugrunde liegen als auch bei *Kindlin*-Knockout-Modellen (KARAKOSE ET AL. 2010).

Da *Kindlin1* vorrangig in den Epithelzellen der Haut exprimiert wird, führen homozygote *Kindlin1*-Mutationen zum charakteristischen Phänotyp des Kindler Syndroms mit Blasenbildung der Haut, Photosensitivität, progressiver Poikilodermie und Hautatrophie (JOBARD ET AL. 2003; SIEGEL ET AL. 2003; LAI-CHEONG ET AL. 2010; HAS ET AL. 2011). Diesen Symptomen scheinen Defizite in der fokalen Zelladhäsion der KS-Keratinocyten zugrunde zu liegen, denn man beobachtet bei diesen Zellen eine geringere Integrin beta1-Aktivierung bei zugleich unveränderter *Talin*- und *Integrin beta1*-Expression (LAI-CHEONG ET AL. 2009). Außerdem sind KS-Keratinocyten kleiner, die Proliferation ist verzögert und auch die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix ist reduziert (HERZ ET AL. 2006). Neben der Haut ist *Kindlin1* aber auch noch in den Epithelien der Blase, der Nieren, des Thymus und des gesamten Magen-Darm-Trakts nachweisbar (USSAR ET AL. 2006). So leiden viele KS-Patienten, häufig bereits im Jugendalter, an parodontischen Veränderungen der Mundschleimhaut. Auch weitere gastrointestinale Veränderungen scheinen mit dem KS assoziiert zu sein (HAS ET AL. 2011).

1.3 Gastrointestinale Symptome im Zusammenhang mit *Kindlin1*-Mutationen

1.3.1 Auftreten von gastrointestinalen Symptomen bei Kindler-Syndrom-Patienten

Bereits in den 1980er und 1990er Jahren wurden Fälle des Auftretens einer CU oder eines MC zusammen mit einer Epidermolysis bullosa beschrieben, bei denen jedoch unklar war, ob es sich um KS-Erkrankungen handelte (GRYBOSKI ET AL. 1988; HUGHES ET AL. 1988; LABEILLE ET AL. 1988; SMITH ET AL. 1993). Deutliche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen *Kindlin1*-Mutationen und gastrointestinalen Symptomen ähnlich einer CED fanden sich erst rund 20 Jahre später (JOBARD ET AL. 2003; LANSCHUETZER ET AL. 2003; OW ET AL. 2006). Sadler et al. beschrieben 2006 den Fall eines Neugeborenen mit sowohl Hautabnormalitäten als auch schweren gastrointestinalen Symptomen ähnlich einer CU. Mutationsanalysen zeigten dann eine homozygote Mutation im Exon 2 des *Kindlin1*-Gens (GRYBOSKI ET AL. 1988; SADLER ET AL. 2006). Ein Jahr später veröffentlichten Kern und Kollegen eine Arbeit, in der ein

Zusammenhang zwischen der beobachteten Häufung von gastrointestinalen Beschwerden bei KS-Patienten und den *Kindlin1*-Mutationen thematisiert wurde. Diese Publikation macht deutlich, dass Kindlin1 nicht nur eine Rolle in der Gewebsintegrität der Hautepithelien spielt, sondern auch mitverantwortlich für die komplexe Funktion der intestinalen Barriere sein kann. Der vollständige Verlust des Kindlin1 Proteins oder eine verkürzte Isoform des Proteins führte in den untersuchten Patienten neben der bekannten KS-Symptomatik zu einem intestinal- inflammatorischen Phänotyp (KERN ET AL. 2007).

1.3.2 Auftreten einer Colitis bei homozygoten *Kindlin1*-Knockout-Mäusen

Auch bei homozygoten *Kindlin1*-Knockout-Mäusen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von Kindlin1 und entzündlichen Veränderungen des Darmes nachgewiesen werden. Bei diesem Tiermodell führt der Einschub einer Neomycinresistenz-Kassette in Exon 2 des *Kindlin1*-Gens zu einem vorzeitigen Transkriptionsstopp und damit zu einem vollständigen Verlust der Funktion des entsprechenden Proteins, welches im Kolon von Wildtyp-Mäusen stark exprimiert wird (USSAR ET AL. 2006). Die zunächst unauffälligen homozygoten Nachkommen entwickeln, neben einer Hautatrophie und verringerter Keratinozyten-Proliferation, zwei Tage nach der Geburt eine, innerhalb von ein bis drei Tagen letal verlaufende, Colitis. Diese ist auf eine intestinale epitheliale Dysfunktion zurückzuführen. Die heterozygoten Tiere entwickeln sich altersgerecht und zeigten, im Gegensatz zu den homozygoten Geschwistertieren, keine klinischen Auffälligkeiten (USSAR ET AL. 2008).

1.4 Chemisch induzierte Colitis durch Natriumdextransulfat im Mausmodell

Um auch in phänotypisch gesunden Tieren, wie den heterozygoten *Kindlin1*-Knockout Mäusen, eine Colitis auszulösen, gibt es die Möglichkeit der chemischen Colitis-Induktion. Diese Colitis-Modelle ähneln in wichtigen histopathologischen und immunologischen Aspekten der CED im Menschen (WIRTZ ET AL. 2007).

Eine etablierte und häufig eingesetzte Methode ist die Gabe von Natriumdextransulfat / Dextran-Sodium-Sulfat (DSS) $[(C_6H_9SO_3Na)_n]$ über das Trinkwasser der Versuchstiere. Diese Methode wurde 1990 erstmals von Okayasu et al. beschrieben (OKAYASU ET AL. 1990).

Das Polymer DSS wirkt direkt toxisch auf die intestinalen Epithelzellen, erhöht dadurch die mukosale Permeabilität und beeinträchtigt somit die Barrierefunktion der Darmmukosa, was

wiederum zu intestinalen Entzündungsprozessen führt (SIEGEL ET AL. 2003). Die so entstehende Colitis ist gekennzeichnet durch Gewichtsverlust, blutige Diarrhoe, Ulzerationen und Granulozyteninfiltration innerhalb der ersten 6-10 Tage nach Versuchsbeginn (OKAYASU ET AL. 1990; WIRTZ ET AL. 2007). Dieses, aufgrund seiner Reproduzierbarkeit, Kontrollierbarkeit und verhältnismäßig einfachen Durchführung weitverbreitete, Modell konnte bereits viel zum Verständnis der Pathophysiologie der CED beitragen (CHASSAING ET AL. 2014).

2 Zielsetzung und Arbeitshypothese

Sowohl bei einigen Kindler-Syndrom-Patienten als auch im *Kindlin1*-Knockout-Mausmodell wird neben dem bekannten Phänotyp der Haut ein gastrointestinaler Phänotyp beobachtet, der Ähnlichkeiten mit CED aufweist. Für Menschen mit heterozygoter *Kindlin1*-Mutation ist nichts dergleichen beschrieben und auch heterozygote *Kindlin1*-Mäuse zeigen primär keine Symptome (USSAR ET AL. 2008).

In der komplexen Ätiologie der CED führt jedoch häufig erst das gemeinsame Auftreten mehrerer Risikofaktoren zur Manifestation der Erkrankung (KUCHARZIK ET AL. 2006; SCHIRBEL ET AL. 2010; LATELLA ET AL. 2012). Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist, ob eine geringere *Kindlin1*-Genexpression beziehungsweise *Kindlin1*-Expression einen Risikofaktor für CED im Kindesalter darstellt.

Dazu sollten zunächst pädiatrische CU- und MC-Patienten auf eine veränderte *Kindlin1*-Expression im Kolon untersucht werden. Für diese Untersuchungen standen Schleimhautbiopsien aus akut entzündeten und makroskopisch nicht entzündeten Darmregionen der Patienten zur Verfügung. Außerdem sollte die Genexpression der *Kindlin1*-assoziierten fokalen Adhäsionsproteine Talin, Paxillin und Integrin beta1 bestimmt werden, um einen möglichen funktionellen Zusammenhang mit der Expression von *Kindlin1* bei der CED im Kindesalter zu untersuchen. Des Weiteren sollte auch die Expression von *Kindlin2* als weiterer Vertreter der Kindlin-Familie gemessen werden. Darüber hinaus sollte die Relevanz der an Patientenmaterial gewonnenen Daten in einer humanen Adenokarzinomzelllinie mittels siRNA-vermitteltem *Kindlin1*-Knockdown überprüft werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte in einem Mausmodell überprüft werden, ob heterozygote Träger einer *Kindlin1*-Mutation eine erhöhte Suszeptibilität für CED haben. Nach Colitis-Induktion durch Natriumdextransulfat bei heterozygoten *Kindlin1*-Knockout-Mäusen und einer entsprechenden Kontrollgruppe (Wildtyp) sollte mit Hilfe klinischer und histologischer Untersuchungen sowie Genexpressionsanalysen verschiedener Entzündungsmarker eine Aussage über die Ausprägung der Colitis-Symptomatik der Tiere getroffen werden. Darüber hinaus sollte in diesem Versuchsablauf ermittelt werden, inwieweit eine intestinale Entzündung auch ursächlich Expressionsänderungen von *Kindlin1*, *Talin*, *Paxillin* und *Integrin beta1* auf mRNA Ebene nach sich zieht.

Insgesamt soll diese Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der vielschichtigen Pathogenese von CED im Kindesalter leisten.

3 Material

3.1 Geräte

Absaugsystem EcoVac	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Abzug mc6, Abzugsarbeitsplatz	WALDNER Labor- und Schuleinrichtungen GmbH, Dresden, Deutschland
accu-jet® pro, Pipettierhelfer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Bioanalyzer 2100	Agilent, Böblingen, Deutschland
Biofuge fresco, temperierbare Mikroliterzentrifuge	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Biofuge pico, Mikroliterzentrifuge	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Tokio, Japan
Düperthal Typ 90 Sicherheitsschrank	Düperthal Sicherheitstechnik GmbH & Co. KG, Kleinstheim, Deutschland
Elektroporator EPI 2500	Dr. L. Fischer Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
Entwicklermaschine CP1000	AGFA, Köln, Deutschland
Feinwaage Te1245	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
GelJet Imager Version 2004	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
GENios Microplatereader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Heizblock MR3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Homogenisator Micra	ART Labortechnik, Müllheim, Deutschland
Homogenisierwerkzeug Picco DS-5/K-1	ART Labortechnik, Müllheim, Deutschland
Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland
Kamera Canon PowerShot G6	Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland
Kühlplatte	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Memmert INP 500 – Wärmeschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Microtom SM2000R	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland

Mikroskop, Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop Olympus BH-2	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikroliterzentrifuge MZ014	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Mikrowelle, Inverter, Dimension 4	Panasonic Deutschland, Hamburg, Deutschland
Mini®-Sub Cell GT	Bio-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Paraffinausgießstation	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
pH-Meter inoLab pH720	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipette 0,5-10 µl, Eppendorf Research®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 10-100 µl, Eppendorf Research®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 100-1000 µl, Eppendorf Research®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Quarzküvette	Suprasil® Hellma, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Sauerstoffmessgerät	Greisinger Electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Schüttelwasserbad GFL-1083	Hilab laboratory and medical instruments, Düsseldorf, Deutschland
Schüttler Rock-N-Roller	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Spannungsgenerator, PowerPac® Basic	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Stickstofftank ARPEGE 140/170	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Kirchen, Deutschland
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments Inc., Neu-Isenburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage Kern EMB 220-1	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Waage Vic-5101	Acculab, New York, USA
Wasserbad	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Wärmeschränk Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Wärmeschränk Memmert INP 500	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland

Xcell II™ Blotting Modul	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Xcell SureLock™ Mini Cell	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
X-Ray Cassette (Entwicklerkassette)	G. Kisker GbR, Steinfurt, Deutschland
Zentrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge J2-21	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge LMC-3000	G. Kisker, Steinfurt, Deutschland

3.2 Software

Literaturverwaltung	EndNote 9.0, Thomson Reuters, New York, USA
Primerdesign	PRIMER-EXPRESS® 2.0, Applied Biosystems, Foster City, California, USA
Statistik	GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc. SPSS 18.0, IBM, Armonk, USA

3.3 Verbrauchsmaterialien

4-12 % Bis-Tris-Gels, NuPAGE® Novex	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
6 Well Platte mit Nunclon Surface	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
14 ml Tubes BD Falcon™	BD, Heidelberg, Deutschland
50 ml Tubes BD Falcon™	BD, Heidelberg, Deutschland
96 Well Platte mit Nunclon Surface	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
Combitips® 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Combitips® 2,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Deckgläser, rechteckig 24 x 60	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Einmalkanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalskalpelle	Servoprax GmbH, Wesel, Deutschland
Elektrophorese-Zelle, Novex Mini-Cell	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Elektroporationsküvetten	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Eppendorf Safe lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe lock Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Handschuhe, puderfrei, Peha-Soft® satin	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Hyperfilm MP Amersham	GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK
Microcon Centrifugal Filter Devices	Millipore GmbH, Schwabach, Deutschland
Nitrocellulosemembran Amersham	GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK
Hybond™-C Extra	

Kryogene Falkons, Nalgene®	Nalge Nunc Int., New York, USA
Objektträger	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1-10 µl, epT.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 2-200 µl, epT.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 50-1000 µl, epT.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere® 1000 µl, mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere® 100 µl, mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere® 10 µl, mit Filter	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht, Deutschland
PCR 5-strip tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR 96 Well Platten	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Serologische Pipetten Corning Stripette®5ml	Costar, Corning Inc., New York, USA
Serologische Pipetten Corning Stripette®10ml	Costar, Corning Inc., New York, USA
Serologische Pipetten Corning Stripette®25ml	Costar, Corning Inc., New York, USA
Zählkammer Glasstic®	Hycor Biomedical Inc., California, USA
Zellkulturflasche, EasyFlasks™, 25 cm ²	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
Zellkulturflasche, EasyFlasks™, 75 cm ²	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland

3.4 Chemikalien und Reagenzien

BIO-RAD Protein Assay 1:5	Bio-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Agarose peqGOLD Universal	PEQLAB Biotechnologie GmbH Erlangen, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Amersham ECL Plus™	GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK
Aqua bidest.	H. Kerndl GmbH, Weißenfeld, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
ChemMate™ Antibody Diluent	DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Eosin Y-Lösung, alkalisch, 0,5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Merck Chemicals Ltd. Darmstadt, Deutschland

Ethylendiamintetracyanat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) 1 x (ohne CaCl_2 , MgCl_2) (GIBCO®)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FCS Fetal Bovine Serum GIBCO®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycergel Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Katzenaufzuchtmilch	Canina® pharma GmbH, Hamm, Deutschland
Loading Dye Solution (6 x)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Magnesiumchlorid	Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Methanol	Merck Chemicals Ltd., Darmstadt, Deutschland
Milchpulver, Blotting grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dextran-Sodium-Sulfat (DSS)	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraffin Paraplast Plus	McCormick Scientific, Richmond, USA
Perjodsäure 0,5 %	Innenstadtapotheke LMU, München, Deutschland
Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Proteaseinhibitortabletten Complete	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Random Hexamere	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Roti-Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schiff'sches Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tri Reagent® RNA Isolation Reagent	Molecular Research Center Inc., Cincinnati, Ohio, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
UltraPure™ DNase/RNase-free Distilled Water	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

X-Ray Entwicklerlösung Roentoroll 25	Tetenal AG, Schützenwall, Deutschland
X-Ray Fixierungslösung Superfix 25	Tetenal AG, Schützenwall, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

3.5 Puffer und Lösungen

Sofern kein anderes Lösungsmittel angegeben ist, wurden alle Puffer in Aqua dest. gelöst.

Blockierungslösung Western Blot:

- 0,1 % Tween 20
 - 5 % Milchpulver
- in PBS

Lysepuffer G:

- 0,2 M Kaliumchlorid
 - 0,3 M TRIS
- in H₂O, pH 7,25
- Zugabe einer Proteaseinhibitortablette pro 10 ml Puffer, kurz vor Gebrauch

Lysepuffer Z:

- PBS mit 0,5 % (w/v) Triton X-100
- 1 mM Natrium- Orthovanadat

PBST:

- D-PBS
- 0,1 % TWEEN® 20

5x SDS-Probenpuffer:

- 2 % SDS
- 5 % β -Mercaptoethanol
- 10 % Glycerin
- 1 mM EDTA
- 0,005 % Bromphenolblau
- 62,5 mM TRIS-HCl (pH 6,8)

STE-Puffer:

- 10 mM TRIS
- 0,1 M Natriumchlorid
- 1 % SDS
- 1 mM EDTA
- pH 8,0

TBE-Puffer:

- 2 mM EDTA
- 89 mM TRIS
- 89 mM Borsäure

TE-Puffer:

- 1 M EDTA
- 10 mM TRIS-HCl (pH 8,0)

Transferpuffer:

- 48 mM TRIS
- 39 mM Glycin

TRIS-Waschpuffer:

- 7,5 mM TRIS
- 44 mM TRIS-HCl
- 0,15 mM Natriumchlorid

Waschpuffer für *Western Blotting*:

- 0,1 % Tween 20 in D-PBS

3.6 KulturmedienMedium für HT29 und HCT116 Zelllinien:

RPMI 1640 Medium (1x), liquid – with GlutaMAX I
+ 10 % Fetal Bovine Serum, Gibco® Certified FCS

Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Medium für Caco2 Zelllinien:

Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)/
Ham's F-12+ 10 % Fetal Bovine Serum, Gibco®
Certified FCS

Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Einfriermedium:

50 % Fetal Bovine Serum, Gibco® Certified FCS
40 % DMEM Medium (+ 1 % Penicillin,
+1% Streptomycin)
10 % Dimethylsulfoxid

3.7 Eukaryotische Zelllinien

Caco2 Humanes kolorektales Adenokarzinom

erhalten von: Prof. A. Jung /
Pathologisches Institut der LMU München

HT29 Humanes kolorektales Adenokarzinom

erhalten von: Prof. A. Jung /
Pathologisches Institut der LMU München

HCT116 Humanes kolorektales Karzinom

erhalten von: Prof. A. Jung /
Pathologisches Institut der LMU München

3.8 Kits

Dako REALTM EnVisionTM Detection System,
Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse

Dako Deutschland GmbH, Hamburg,
Deutschland

Elektrophoresepuffer NuPAGE

Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

SDS Running Buffer 20x

Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

HemoCare (Test auf okkultes Blut im Stuhl)

CARE diagnostica Laborreagenzien GmbH,
Voerde, Deutschland

NuPAGE Large Protein Blotting Kit

Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

RNase Free DNase Set

QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

RNeasy® Mini Kit

QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

Roti®-Histokitt

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

3.9 Größenstandards

Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
HiMark Prestained Protein Marker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.10 Enzyme

iTaq SYBR Green Supermix with ROX	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Maxima Hot Start <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ribonuclease H (RNase H)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA 1x	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Trypsin-EDTA (1:250)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.11 Primer

Alle Primer wurden mit Hilfe der Software PRIMER-EXPRESS® 2.0 designed und bei der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bestellt. Die Primer wurden in lyophilisierter Form in *salt free* Aufreinigung bezogen und in RNase-/DNase-freiem Wasser gelöst.

3.11.1 Humane *real-time* PCR Primer

Gen	Primer Sequenz forward 5'→ 3'	Primer Sequenz reverse 5'→ 3'	Lokalisation
<i>IL8</i>	AGAGTGATTGAGAGTGGACCACAC	TGCACCCAGTTTTCCTTGG	Exon 2/3
<i>Integrin beta1</i>	GTTTCGATGCCATCATGCAA	CCGGCATCTGTGGAACAC	Exon 6/7
<i>Kindlin1</i>	CAGTCCCAGAAGCACTTGC	TCCATAAGGGAGCGTGAGGA	Exon 5/6
<i>Kindlin2</i>	TCCAGTTGCAGAAGGCATGA	GGAGGCTAATCTGCAGGCTG	Exon 11/12
<i>Paxillin</i>	TGAAAAGGACTACCACAACCTCTTC	CGTCCGGTCAAGGGCTG	Exon 8/9
<i>Talin</i>	TTCAGCACCTTCCTGGAAGC	TGCCCTCAAGTTGGACACA	Exon 29/30
<i>TBP</i>	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT	Exon 4/5

3.11.2 Murine *real-time* PCR Primer

Gen	Primer Sequenz forward 5'→ 3'	Primer Sequenz reverse 5'→ 3'	Lokalisation
<i>Ifng</i>	ATGCATTCATGAGTATTGCCAAGT	GCTGGACCTGTGGGTGTTG	Exon 3/4
<i>Il1b</i>	CTTCCCGTGGACCTTCC	TCATCCCATGAGTCACAGAGGAT	Exon 4/5
<i>Il6</i>	CTTAATTACACATGTTCTCTGGGAAATC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	Exon 2/3
<i>Integrin beta1</i>	CAGTGAATGGCAACAATGAAGC	ACGCCTGCTACAATTGGGAT	Exon 14/15
<i>Kindlin 1</i>	GACATCCTGAACCTGGAAAGTTCT	GGTCGTATGTGGGTGTCATGG	Exon 4/5
<i>Paxillin</i>	GCCTAGTGGTTCAGATACGCT	GGTGTGGAGGCACTGGAATT	Exon 2/3
<i>Talin</i>	TAGATCAGGCTTCGCTTGCC	GCAGTGAGCATCTGGGTGTG	Exon 38/39
<i>Tbp</i>	GCCCGAAACGCCGAATAT	ACGTGGGCTACAGGCTTGTC	Exon 4/5
<i>Tnfa</i>	CAAATGGCCTCCCTCTCATC	ACGTGGGCTACAGGCTTGTC	Exon 2/3

3.11.3 Murine Genotypisierungsprimer

Gen	Primer Sequenz forward 5'→ 3'	Primer Sequenz reverse 5'→ 3'	Lokalisation
Kindlin1	TTCATCCTAAACTCAGCTTGC	TGCCTTCCATTCAAGACACA	Exon 2/3
PGK polyA down	CTGCTCTTTACTGAAGGCTCTTT		

3.12 Antikörper

Alle Antikörper wurden entsprechend der angegebenen Verdünnung kurz vor der Verwendung in PBST mit in 5 % BSA verdünnt.

3.12.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Hersteller
β-Actin	Rabbit polyclonal	1:1000	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA
PARP	Rabbit polyclonal	1:1000	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA

3.12.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Hersteller
Anti-Rabbit-HRP	Goat IgG monoclonal	1:1000	Thermo Fisher Scientific
Anti-Mouse-HRP	Goat IgG monoclonal	1:1000	Thermo Fisher Scientific

3.13 siRNA

Kindlin1: Hs_C20orf42_5 TTGCAAGATTGTGCACGAGTA [1 nmol] (Qiagen)
 Hs_C20orf42_6 CAGGTGGCTCCAGTCTCGAA [1 nmol] (Qiagen)
 Hs_C20orf42_7 CAGGTAGCAGTTGACAACCCA [1 nmol] (Qiagen)
 Hs_C20orf42_8 GAGTCCGAGGTTGATGAAATA [1 nmol] (Qiagen)

Kontrolle: siGENOME Non-Targeting siRNA #1 D-001210-01-05 [5 nmol] (Dharmacon)

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivieren und Passagieren eukaryotischer Zelllinien

Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese zügig in der Hand aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtem (37°C) Zellkulturmedium mit 10 % FCS (fetales Kälberserum) aufgenommen. Zur vollständigen Abscheidung des Einfriermediums wurden die Zellen für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml Zellkulturmedium mit 10 % FCS resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in eine 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Um die abgestorbenen Zellen aus der Kultur zu entfernen, wurde am nächsten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90 % erreichten, wurden sie passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit D-PBS gespült und für 3 min bei 37°C mit 500 µl Trypsin inkubiert. Das Trypsin wurde langsam abgesaugt und die Zellen für weitere 3 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Proteasereaktion mit Medium (+ 10 % FCS) abgestoppt und die Zellen durch Resuspendieren vereinzelt. Je nach Bedarf wurde der gewünschte Anteil der Zellsuspension mit frischem Zellkulturmedium + 10 % FCS aufgefüllt, in Zellkulturflaschen ausgesät und weiter kultiviert.

4.1.2 Knockdown von *Kindlin1* durch siRNA-Transfektion in HT29 Zellen

Zur Reduktion der Genexpression von *Kindlin1* in der humanen Kolonadenokarzinomzelllinie HT29 wurde die siRNA-Transfektion angewandt. Dazu wurden die, über Nacht vorinkubierten, Zellen durch Trypsinierung geerntet, je 2×10^6 Zellen pro Transfektionsansatz in Elektroporationsküvetten überführt und mit je 80 pmol siRNA versetzt. Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation bei 250 V für 10 ms. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor sie zur RNA-Isolation geerntet wurden. Für den Knockdown wurden vier verschiedene siRNAs gegen *Kindlin1* sowie eine non-target siRNA als Kontrolle verwendet (siehe 3.13).

4.2 Gewinnung des humanen Probenmaterials

Vor Beginn der Arbeiten wurde ein positives Ethikvotum bei der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität eingeholt (Projektnr. 104-05).

4.2.1 Patientengruppe

Die zu untersuchende Patientengruppe bestand aus Kindern mit einer eindeutig als MC oder CU diagnostizierten CED.

Probennummer	Diagnose	Alter in Jahren bei Erstdiagnose	Alter in Jahren bei Probenentnahme	Ausdehnung (Montreal-Klassifikation)	Geschlecht	Gewebe entzündet (P) oder nicht (N)
17	MC	10	18	L2	m	N
18	MC	10	18	L2	m	P
57	MC	9	18	L1	m	N
73	MC	6	6	L2	m	P
93	MC	6	9	L1-4	m	N
104	CU	3	3	E2	m	P
116	MC	8	10	L2	m	N
125	CU	12	12	E2	m	P
126	CU	12	12	E2	m	N
144	MC	14	k.A.	L1-4	w	N
156	CU	14	14	E3	m	P
157	CU	14	14	E3	m	N
158	CU	12	12	E2	w	N
189	CU	16	19	E1	m	N
234	MC	13	14	L1-2	m	N
253	MC	15	19	L1-2	m	P
271	MC	10	10	L1-4	m	N
272	MC	10	10	L1-4	m	P
316	MC	16	16	L1-4	w	N
317	MC	16	16	L1-4	w	P
347	MC	13	16	L1-3	m	P
359	CU	13	13	E2	w	P
360	CU	13	13	E2	w	N
364	CU	12	14	E3	m	P
370	MC	4	6	L1-4; L4+	m	P
371	MC	17	17	L1-3	w	P
377	MC	15	16	L3	m	P
378	MC	15	16	L3	m	N
379	MC	16	19	L1	m	N
380	MC	16	19	L1	m	P
381	MC	9	11	L1-4	m	N
385	CU	14	16	E3	m	N
386	CU	14	16	E3	m	P
390	MC	12	12	L1	m	P
397	CU	9	14	E2	w	P
398	CU	9	14	E2	w	N
401	CU	10	10	E3	m	P
468	MC	16	18	L1; L4	w	N
469	MC	16	18	L1; L4	w	P
474	MC	10	15	L1-2	w	N
574	CU	1	1	E2	w	P

Tabelle 1: Detaillierte Angaben über die Herkunft der Proben der Patientengruppe einschließlich Montreal-Klassifikation ausgewertet nach (BAUMGART 2009)

Weitere Voraussetzung war, dass bei den Patienten eine Biopsierung des Darmes oder Darmresektion indiziert war.

Tabelle 1 gibt Auskunft über die Herkunft der jeweiligen Patientenprobe und beinhaltet Diagnose, Alter bei Erstdiagnose, Alter bei Probenentnahme, Montreal-Klassifikation und Geschlecht des entsprechenden Teilnehmers der Patientengruppe. Außerdem ist angegeben, ob die Probe aus einem entzündeten (P) oder nicht entzündeten (N) Darmabschnitt entnommen wurde.

4.2.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bildeten Kinder, bei denen ebenfalls die medizinische Notwendigkeit für die Entnahme einer Gewebeprobe aus dem Darm bestand, jedoch keine CED oder anderweitige entzündliche Veränderung der Darmschleimhaut vorlag.

Probennummer	Alter in Jahren bei Probenentnahme	Geschlecht
32	5	w
400	6	w
432	9	w
436	9	w
493	1	m

Tabelle 2: Angaben über die Herkunft der Proben der Kontrollgruppe

4.2.3 Biopsierung

Im Rahmen einer medizinisch notwendigen Koloskopie wurden den Patienten ebenso wie der Kontrollgruppe zwei bis vier zusätzliche Biopsien entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Biopsien der CED-Patienten wurden, soweit dies möglich war, sowohl aus makroskopisch entzündeten (P) als auch aus makroskopisch nicht entzündeten (N) Regionen des Darmes entnommen. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Material in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2.4 Mukosapräparation

Um aus Darmresektaten ebenfalls nur die Mukosa zu erhalten, wurde das Gewebstück mit Nadeln aufgespannt und mit PBS oder physiologischer Kochsalzlösung unterspritzt. Daraufhin konnte die Mukosa abpräpariert werden. Das erhaltene Material wurde ebenfalls

in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.3 Tierexperimentelle Arbeiten

Den tierexperimentellen Arbeiten ging ein Tierversuchsantrag voraus, der unter dem Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531-61-09 von der Regierung von Oberbayern genehmigt worden war.

4.3.1 Heterozygote *Kindlin1*-Knockout-Maus

Mit Hilfe des Tiermodells wurde untersucht, ob eine geringere *Kindlin1*-Gendosis, bedingt durch das Tragen einer heterozygoten *Kindlin1*-Mutation, Einfluss auf das CED-Risiko hat. Zu diesem Zweck wurde ein heterozygoten *Kindlin1*-Knockout-Mausmodell, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Reinhard Fässler (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried), herangezogen. Bei diesen Mäusen ist das Start-Codon im Exon 2 eines *Kindlin1*-Allels durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt (USSAR ET AL. 2008).

4.3.2 Wildtyp-Maus

Die Vergleichsgruppe bestand aus den Wildtyp-Geschwistern des jeweiligen Wurfes, ebenfalls in einem Alter von 8-10 Wochen.

4.3.3 Natriumdextransulfat-Colitis-Mausmodell

Um die Suszeptibilität der heterozygoten *Kindlin1*-Knockout-Mäuse und der Wildtyp-Gruppe auf eine Colitis-Induktion zu untersuchen, wurde das von Okayasu et al. entwickelte DSS-Colitis-Modell etabliert (OKAYASU ET AL. 1990). Dazu erhielten 8 - 10 Wochen alte C57BL/6-*Kindlin1*^{+/-}-Mäuse und ihre Wildtyp-Geschwister über einen definierten Zeitraum 2 % DSS-haltiges Trinkwasser *ad libitum*, um eine akute Colitis zu induzieren (WIRTZ ET AL. 2007). Bei den weiblichen Tieren erstreckte sich der Behandlungszeitraum über 9 Tage, bei den männlichen Tieren nur über 7 Tage, da die Männchen im Vergleich zu den Weibchen in den Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) einen deutlich progressiveren Colitisverlauf auf die DSS-Behandlung hin zeigten. Eine ebenfalls 9-tägige DSS-Behandlung der männlichen Tiere hätte demnach aus ethischen Gründen eine hohe Zahl an Versuchsabbrüchen nach sich gezogen.

Eine Kontrollgruppe (*Kindlin1*^{+/-}- und Wildtyp-Individuen) erhielt normales Trinkwasser ohne DSS und wurde ansonsten unter analogen Bedingungen gehalten.

4.3.4 Klinisches Monitoring

Die Versuchstiere wurden täglich einem klinischen Monitoring unterzogen (Versuchsbogen siehe 13.1.). Hierbei wurde zunächst der Allgemeinzustand der Tiere beurteilt. Dazu wurde untersucht, ob die Mäuse normal lebhaft, in ihren Reaktionen und Bewegungen verlangsamt oder lethargisch waren. Da die Behandlung mit DSS-haltigem Trinkwasser und die dadurch induzierte Colitis in der Regel zu einem Gewichtsverlust führt, wurde das Gewicht der Tiere ermittelt, indem sie, in einem Becherglas sitzend, auf einer digitalen Briefwaage gewogen wurden. Außerdem wurde abgewartet, bis die Tiere Stuhl im Becherglas absetzten. Der Stuhl wurde auf einen guajakbasierten Test für okkultes Blut im Stuhl aufgebracht. War der Stuhl noch sehr fest, wurde er mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, um die optimale Detektion durch den Test zu gewährleisten. Zuletzt wurden die Tiere körperlich untersucht. Dabei wurde der Bauch der Tiere abgetastet und auf eine mögliche Verhärtung oder ein aufgeblähtes Abdomen geachtet. Weiterhin wurde per Sichtkontrolle festgestellt, ob die Mäuse sichtbares Blut im Afterbereich aufwiesen. Zeigte sich ein Tier lethargisch, hatte es ein aufgeblähtes Abdomen, Atemnot oder bereits über 20 % seines Ausgangsgewichts verloren, wurde das Tier vorzeitig aus dem Versuch genommen und euthanasiert. Ebenfalls per Sichtkontrolle konnte festgestellt werden, ob sich die Flanken der Maus beim Atmen stark nach innen ziehen, was, auch ohne sichtbar aufgeblähtes Abdomen, auf Schmerzen hindeutet. Dies stellte nach spätestens 3-tägiger Beobachtung ein weiteres Abbruchkriterium dar.

Am Ende des Versuches wurden alle Tiere durch Genickbruch euthanasiert. Das Abdomen wurde eröffnet, der Darm präpariert und begutachtet. Das Kolon wurde mit PBS gespült und die Länge bestimmt. Anschließend wurde der rektale Abschnitt geteilt und in Paraffin eingebettet sowie zur Isolierung von RNA und Proteinen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.4 Konservierung der murinen Gewebeproben

Um die Kolonproben der Versuchstiere aus dem DSS-Colitis-Modell und der zugehörigen Kontrolltiere zu konservieren und im weiteren Verlauf histologisch untersuchen zu können, mussten diese zunächst in Paraffin eingebettet werden.

4.4.1 Paraffineinbettung von Gewebe

Zur Einbettung der murinen rektalen Kolonabschnitte in Paraffinblöcke wurden die Gewebestücke sofort nach der Präparation in 4 % Formaldehyd fixiert. Nach spätestens 3 Tagen folgte die Entwässerung und Einbettung nach folgendem Protokoll:

- Inkubation für 2 mal 30 min in 50 % Ethanol
- Inkubation für 2 mal 30 min in 70 % Ethanol
- Inkubation für 2 mal 30 min in 96 % Ethanol
- Inkubation für 2 mal 30 min in 100 % Ethanol
- Inkubation für 30 min in Roti-Histol oder Xylol
- Inkubation für 2 mal 1 h in 1:2 Roti-Histol in Paraffin oder 1:2 Xylol in Paraffin
- Inkubation für 2 mal 1 h in Paraffin
- aufrechte Einbettung der Darmstücke in Paraffinblöcke

Aus den fertigen Paraffinblöcken wurden mittels Mikrotom Darmquerschnitte von 2 µm bis 4 µm Dicke angefertigt, auf Objektträger übertragen und über Nacht bei 37°C fixiert.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Isolation von DNA aus Gewebe

Die DNA der Versuchstiere wurde aus einem Gewebestück, meist der Schwanzspitze, nach folgendem Protokoll isoliert:

- Inkubation des Gewebes in 500 µl STE-Puffer (+50 µl Proteinase K) über Nacht
- Zentrifugation für 10 min bei 12.000 rpm und Überführung des Überstands in ein neues Tube
- DNA-Ausfällung durch Zugabe eines Volumens Isopropanol und anschließende Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur
- 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm und anschließend vorsichtiges Abnehmen und Verwerfen des Überstands
- Waschen des Pellets in 500 µl Ethanol (70 %)

- erneute Zentrifugation bei 12.000 rpm für 10 min
- Abnehmen und Verwerfen des Überstands und Trocknung der DNA an der Luft für etwa 5 min
- 10-minütige Inkubation bei 60°C in 50 µl Aqua dest. zum Lösen der isolierten DNA

Eine anschließende photometrische Messung gab Auskunft über Reinheit und Konzentration der isolierten DNA.

4.5.2 Genotypisierung der Versuchstiere

Die isolierte DNA wurde zur Genotypisierung der Versuchstiere eingesetzt. Dazu wurden je 50 ng Template-DNA in 0,6 µl Aqua dest. zu 29,4 µl Mastermix (siehe Tabelle 3) gegeben und eine Genotypisierungs-PCR (Ablauf siehe Tabelle 4) durchgeführt.

Primer Kindlin1 forward	10 µM
Primer Kindlin1 reverse	10 µM
Primer PGK PolyA down	10 µM
dNTPs	10 mM
Maxima Hot Start Taq	0,65U (5U/1µl)
Hot Start Taq-Puffer	10x (3µl)
MgCl ₂	25 mM
H ₂ O	ad 29,4 µl

Tabelle 3: Mastermixzusammensetzung pro 0,6 µl Template für Genotypisierungs-PCR

Initiale Denaturierung	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation	Terminale Elongation
	40 Zyklen			
3 min	30 s	30 s	30 s	5 min
95°C	95°C	53°C	72°C	72°C

Tabelle 4: PCR Programm zur Genotypisierung von *Kindlin1*-Mutationen

4.5.3 RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellen und Gewebe

Um RNA aus Gewebe zu isolieren, wurden Gewebstücke einer Größe von etwa 3 mm x 2 mm x 1 mm (entspricht 2 Schleimhautbiopsien) mit Hilfe eines Homogenisators in 1 ml TRI Reagent® homogenisiert. Für die Isolierung von totaler RNA aus adhärenenten Zellen

wurden diese hingegen durch Zugabe von 1 ml TRI Reagent® pro einem 6-Well geerntet und lysiert. Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog nach folgendem Protokoll:

- Phasentrennung: Zugabe von 400 µl Chloroform, anschließendes Vortexen für 15 s, daraufhin 3-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 12.000 rpm
- Abnehmen der oberen, wässrigen Phase und Fällung mit gleichem Volumen an Isopropanol
- 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und erneute Zentrifugation bei 4°C und 12.000 rpm für 10 min
- Waschen des so entstandenen RNA-Pellets mit 1 ml gekühltem Ethanol (70 %) durch Vortexen und anschließende 5-minütige Zentrifugation bei 7.500 rpm und 4°C
- Kurze Lufttrocknung der RNA und anschließendes Lösen in 102 µl Aqua dest. für 15 min bei 55°C

Eine anschließende photometrische Messung gab Auskunft über Reinheit und Konzentration der isolierten RNA.

4.5.4 DNase-Verdau

Um etwaige Verunreinigungen durch DNA zu beseitigen, wurde an die RNA-Isolierung ein DNase-Verdau unter Verwendung des RNeasy® Mini Kits und dem RNase Free DNase Set angeschlossen. Der DNase-Verdau erfolgt nach dem vom Hersteller mitgelieferten Versuchsprotokoll:

- Auffüllen von maximal 100 µg RNA mit DNase-/RNase-freiem Aqua dest. auf ein Endvolumen von 100 µl
- Mischen dieses Ansatzes mit 350 µl RLT-Puffer (+1 % β-Mercaptoethanol)
- Zusätzliches Zugeben von 250 µl 100 %-igem Ethanol und Überführen des gemischten Ansatzes auf eine RNeasy-Säule
- Zentrifugation bei 8.000 rpm für 15 s und anschließendes Verwerfen des Durchflusses
- Waschen durch Zugabe von 350 µl RW1-Puffer auf die Säule, Zentrifugation bei 8.000 rpm für 15 s und Verwerfen des Durchflusses
- Verdau der verbleibenden DNA durch 15-minütige Inkubation mit 80 µl DNase-RDD-Puffer-Lösung

- Waschen durch Zugabe von 350 µl RW1-Puffer auf die Säule, Zentrifugation bei 8.000 rpm für 15 s und Verwerfen des Durchflusses
- Erneute Zentrifugation für 2 min bei 8.000 rpm nach Zugabe von 500 µl RPE Puffer
- Verwerfen des Durchflusses und weitere Zentrifugation für 1 min bei 12.000 rpm
- Eluieren der RNA durch Zugabe von (je nach RNA Menge) 20 - 30 µl DNase-/RNase-freiem Aqua dest., einer Inkubation von 1 min und anschließend 1-minütiger Zentrifugation bei 8.000 rpm (Wiederholung dieses Schritts, um eine weitestgehend vollständige Elution der RNA zu erreichen)

Alle Versuchsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Eine anschließende photometrische Messung gab Auskunft über Reinheit und Konzentration der DNase-verdauten RNA, die zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert wurde.

4.5.5 cDNA-Synthese

Vorbereitend für die quantitative *real-time* PCR wurde die isolierte RNA mittels reverser Transkription nach folgendem Protokoll in cDNA umgeschrieben:

- Auffüllen von 2 µg RNA mit RNase-/DNase-freiem Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 7 µl und Inkubation mit 5 µl *random hexamere* (20 ng/µl) für 10 min bei 70°C (War die RNA-Konzentration zu gering, wurde diese zunächst mit Hilfe von Microcon Centrifugal Filter Devices, den Herstellerangaben folgend, aufkonzentriert.)
- Zugabe von je 4 µl 5x 1st strand buffer, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) und 1 µl 10 mM dNTPs
- Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur
- Inkubation für 2 min bei 42°C
- Zugabe von 1 µl reverser Transkriptase (SuperScript® II) und vorsichtiges Mischen
- Inkubation von mindestens 1 h bei 42°C
- Inaktivierung der reversen Transkriptase durch 10-minütige Inkubation bei 70°C
- Verdau der verbliebenen RNA durch Inkubation mit 1 µl RNase H für mindestens 20 min bei 37°C

Die so synthetisierte cDNA wurde mit RNase-/DNase-freiem Aqua dest. auf 100 µl aufgefüllt und, bis zur weiteren Verwendung, bei -20°C gelagert.

4.5.6 Quantitative *real-time* PCR

Die mRNA-Expression der zu untersuchenden Gene wurde mit Hilfe quantitativer *real-time* PCR analysiert. Die cDNA-Synthese lieferte eine cDNA-Konzentration von 20 ng/μl. Davon wurden je 2 μl eingesetzt und mit jeweils 18 μl Master Mixes, bestehend aus 10 μl iTaq SYBR® Green Supermix with ROX, 6 μl Aqua dest. und je 1 μl des entsprechenden Vorwärts- und des Rückwärtsprimers (10μM), versetzt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind unter Punkt 3.11 aufgeführt. Die PCR lief in Doppelbestimmungen nach dem in Tabelle 5 aufgeführten Programm ab. Die ermittelten Ergebnisse jedes zu untersuchenden Gens wurden anschließend auf das *Housekeeping*-Gen *TBP* normiert.

Initiale Denaturierung	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation	Schmelzkurve		
	40 Zyklen					
2 min	15 s	15 s	20 s	15 s	20 min	15 s
95°C	95°C	55°C	68°C	95°C	55-95°C	95°C

Tabelle 5: PCR-Programm zur quantitativen Bestimmung der Genexpressionsrate

4.6 Proteinbiochemische Methoden

4.6.1 Proteinisolation aus adhärennten Zellen und Gewebe

Zur Isolierung von Protein aus Zellen wurden diese abtrypsiniert, 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 1.200 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen und die Zellen je nach Anzahl in 50 - 150 μl Lysepuffer Z resuspendiert.

Für die Proteinisolation aus Gewebe hingegen wurde ein Gewebsstück von etwa 4 mm x 2 mm x 1 mm in Lysepuffer G mit Hilfe eines Stabhomogenisators auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden sowohl Zell- als auch Gewebslysate 30 min auf Eis inkubiert und dann für weitere 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Lysat wurde abgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

4.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteine anschließend zu quantifizieren, wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Hierzu wurde zunächst eine BSA (*bovine serum albumin*) Standardreihe mit den Konzentrationen 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 und 1,2 mg/ml Protein erstellt. Jeweils 10 µl der zu bestimmenden Probe wurden zusammen mit 200 µl Bradford Reagenz in eine 96-Well Platte pipettiert, wobei jede Konzentration doppelt bestimmt wurde. Außerdem wurden analog 1 µl der jeweiligen Probe mit 9 µl PBS und 200 µl Bradford Reagenz auf die Platte pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm im Photometer.

4.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden zunächst 20 µg Protein mit PBS auf 20 µl aufgefüllt. Dem wurden 5 µl *Loading Dye* zugesetzt und die Proteine anschließend für 10 min bei 99°C denaturiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm wurden je 20 µl der Proben und 4 µl des Größenstandards Page Ruler® auf ein 4-12 %-iges Bis/TRIS Gel geladen. Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli erfolgte bei 200 V und 110 mA für 50-80 min.

4.7 Immunologische Methoden

4.7.1 Western Blot

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine folgte das *Western Blotting*. Dazu wurden die Proteine mittels *wet-blotting*-Verfahren (bei 25 V und 100 mA für 90 min) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nachfolgend wurden die freien Bindungsstellen der Blotmembran durch eine 2-stündige Inkubation mit 5 % Milchpulver in PBST abgeblockt. Nach einem Waschschrift (3 mal 5 min in PBST) erfolgte, über Nacht, die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C. Einem weiteren Waschschrift (3 mal 5 min in PBST) folgte die 1-stündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Daraufhin schloss sich ein weiterer Waschschrift von 3 mal 5 min in PBST an.

Zur Visualisierung wurden 1025 µl ECL-Plus für 2 min auf die Membran gegeben und die Meerrettichperoxidase-vermittelte Chemolumineszenz mit Hilfe von *Western Blot*-Filmen detektiert. Die genauen Angaben zur Antikörperverdünnung sind unter 3.12 aufgeführt.

4.8 Histologische Färbungen

4.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zum Anfärben des Darmes wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angewendet. Dazu wurden 2 µm bis 4 µm dicke Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert. Dies erfolgte durch eine 2 mal 10-minütige Inkubation in Xylol, woran sich die je 3-minütige Inkubation in einer absteigenden Ethanolreihe (100 % → 96 % → 70 %) anschloss. Die vorbereiteten Schnitte wurden für 2 min in Hämaunlösung getaucht, wodurch vor allem basophile Strukturen wie die Zellkerne sichtbar gemacht werden können, und im Anschluss 2 min unter fließendem Wasser gebläut. Darauf folgte eine Inkubation für 20 s in Eosin zur Visualisierung der basischen Strukturen wie Zellplasmae. Nach einer anschließenden Entwässerung mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 % → 96 % → 100 %), endend in Xylol, wurden die Schnitte mit Hilfe des Roti®Histokitts eingedeckt.

4.8.2 *Periodic acid-Schiff*-Reaktion

Um die Becherzellen der Darmschleimhaut nachzuweisen und zu quantifizieren, wurden die dicht gefüllten Schleimgranula dieser Zellen mit Hilfe der *Periodic acid-Schiff* (PAS)-Reaktion angefärbt.

Bei der Verwendung von Paraffinschnitten wurden diese, wie unter Abschnitt 4.8.1 beschrieben, zunächst entparaffiniert und die Schnitte darauf hin kurz in Aqua dest. getaucht. Anschließend wurden die Schnitte 30 min bei 56°C in 0,5 % Perjodsäure (H₅IO₆) inkubiert. Nach einem 5-minütigen Waschschriff in Aqua dest. folgte eine Inkubation in Schiff'schem Reagenz für 45 min bei Raumtemperatur. Einem weiteren Waschschriff von 15 min in Wasser schloss sich eine 6-minütige Inkubation in Hämaun an. Nach 15 min Bläuen in Wasser wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe wieder entwässert und nach einer kurzen Inkubation in Xylol mit Hilfe des Roti-Histokitts eingedeckt.

4.8.3 Schema zur Auswertung der Gewebeschnitte

Zur Beurteilung der Kryptenstruktur, der Mukosaintegrität sowie der Quantität und Verteilung der Becherzellen wurden komplette Darmquerschnitte nach in Tabelle 6 dargestelltem Schema ausgewertet:

Bewertungsgegenstand	Beobachtung	Auswertung
Kryptenstruktur	Im gesamten Schnitt klar und vollständig erkennbar	intakt
Kryptenstruktur	Von Infiltraten unterbrochen, degenerierte Krypten oder keine Kryptenstruktur mehr erkennbar	geschädigt
Mukosaintegrität	Mukosaschicht im gesamten Schnitt gut erkennbar auf der Epithelschicht aufgelagert	intakt
Mukosaintegrität	Mukosaschicht stellenweise oder komplett fehlend	geschädigt
Quantität der Becherzellen	Um weniger als 25 % reduzierte Anzahl im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen	normal
Quantität der Becherzellen	Um mehr als 25 % reduzierte Anzahl im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen oder abschnittsweise vollständiges Fehlen der Becherzellen	reduziert
Verteilung der Becherzellen	Gleichmäßig über den gesamten Schnitt verteilte Becherzellen erkennbar	normal
Verteilung der Becherzellen	Bereiche mit fehlenden Becherzellen erkennbar	ungleich

Tabelle 6: Auswertungsschema zur Beurteilung der HE- und PAS-gefärbten Maus-Kolonquerschnitte

4.9 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Software GraphPad Prism 5 durchgeführt. Um zu untersuchen, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen bestand, kam der Mann-Whitney U Test zur Anwendung. Die Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Test nach Spearman und wurden durch die Darstellung der linearen Regression ergänzt. Die statistische Auswertung der Kaplan-Meier Verteilung wurde mit dem Gehan-Breslow-Wilcoxon Test durchgeführt. Die statistische Auswertung des histologischen Scores erfolgte mit Chi-Quadrat-Test ohne Korrektur. Das Signifikanzniveau ist in allen Tests für $p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,005$: *** definiert.

5 Ergebnisteil I: Genexpressionsanalysen in Darmbiopsien kindlicher CED-Patienten und im Zellkulturmodell

5.1 Expression von *Kindlin1*, *Talin*, *Paxillin* und *Integrin beta1* in der Kolonmukosa kindlicher CED-Patienten

Um zu untersuchen, ob bei pädiatrischen CED Patienten eine im Vergleich zu einer Kontrollgruppe veränderte Genexpression der fokalen Adhäsionsproteine, insbesondere von *Kindlin1*, auftritt, wurden quantitative *real-time* PCR Analysen in Kolonmukosaproben kindlicher CED-Patienten durchgeführt.

Eine Genexpressionsanalyse des Entzündungsmarkers Interleukin-8 (IL8) validierte die makroskopische Einteilung der Gewebsbiopsien in Proben aus entzündeten (P) und nicht entzündeten (N) Darmrealen. Abbildung 5-1a zeigt sowohl bei CU als auch bei MC eine signifikant erhöhte Entzündungsaktivität in Form einer gesteigerten *IL8*-Expression im makroskopisch entzündeten Gewebe im Vergleich zu makroskopisch nicht entzündetem Gewebe. Die Kontrollgruppe ohne Darmentzündung wies im Vergleich zu allen CED-Gruppen (N+P) eine signifikant geringere *IL8*-Expression auf. Die mRNA des fokalen Adhäsionsproteins Beta1-Integrin war ebenfalls im entzündeten Gewebe der CED Patienten (MC und CU) signifikant höher als im nicht entzündeten (Abbildung 5-1b). Für *Kindlin1* hingegen zeigte sich keine Expressionssteigerung in den entzündeten Darmabschnitten der CED-Patienten gegenüber den nicht entzündeten Arealen. Auch war die *Kindlin1*-Expression der CED-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe nicht erhöht (Abbildung 5-1c). Auffallend ist, dass die Datenpunkte in der MC (N) Gruppe eine deutliche Zweiteilung (unter 5- und über 7-fach TBP) aufwies. Anders als bei *Kindlin1* zeigte sich bei *Kindlin2* (Abbildung 5-1d) ein signifikanter Expressionsanstieg in entzündetem Gewebe von MC- und CU-Patienten gegenüber nicht entzündetem Gewebe der jeweiligen Gruppe. Auch war die *Kindlin2*-Expression im entzündeten Gewebe der CED-Patienten signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Abbildung 5-1d). Die *Kindlin2*-Expression im nicht entzündeten Gewebe der Patienten blieb verglichen mit den Kontrollen unverändert.

Die intestinale Entzündung der CED-Patienten geht demnach mit einem *IL8*-Anstieg sowie einer erhöhten *Kindlin2* und *Integrin beta1*-Expression einher, was die positive Korrelation von *Integrin beta1* und *IL8* beziehungsweise *Kindlin2* und *IL8* zeigt (Abbildung 5-2).

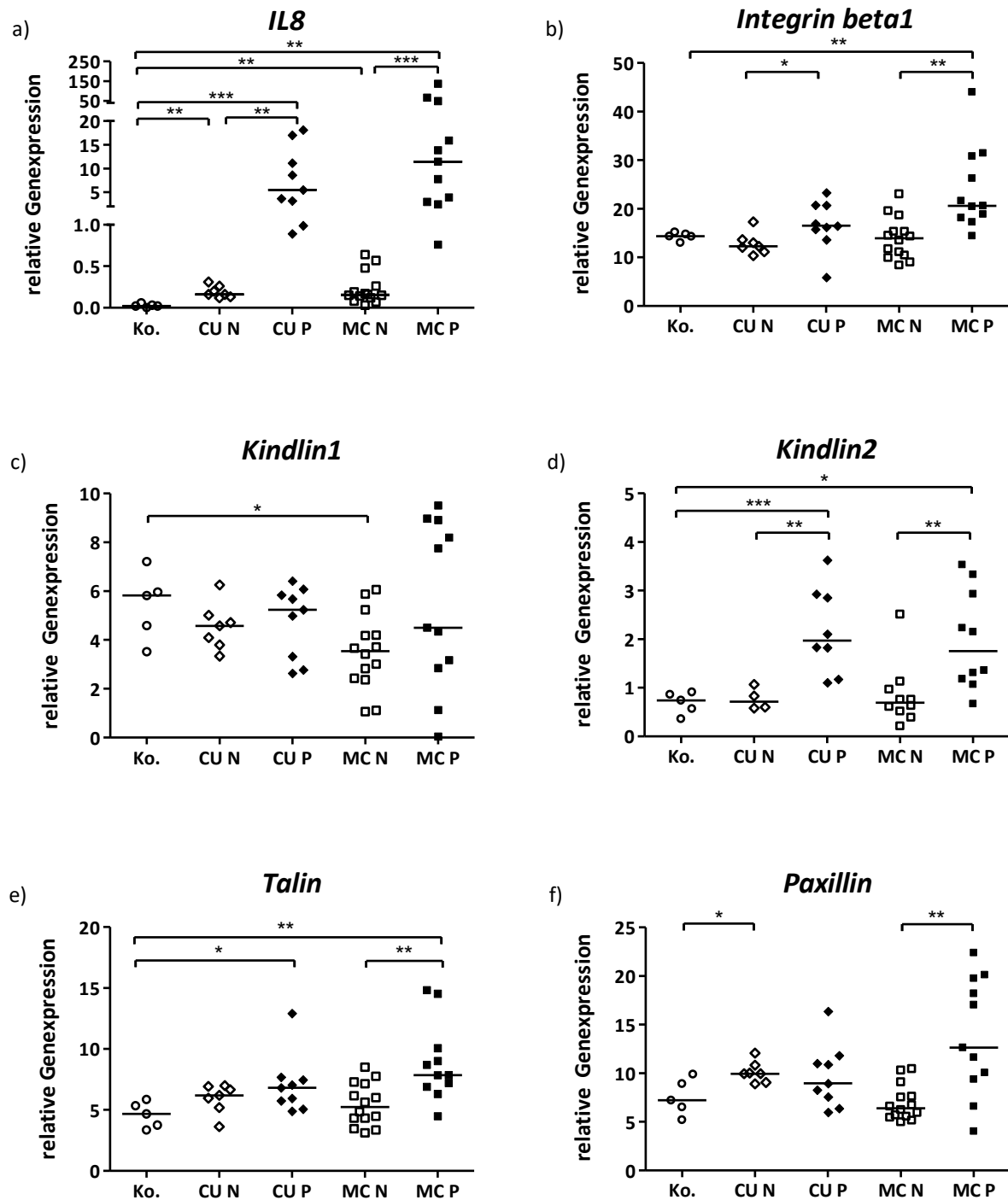


Abbildung 5-1: Genexpression von *IL8* (a), *Integrin beta1* (b), *Kindlin1* (c), *Kindlin2* (d), *Talin* (e) und *Paxillin* (f) im Kolon pädiatrischer CED-Patienten

Dargestellt ist die relative Genexpression (*TBP*-normiert) (Einzeldaten und Median) in entzündeten (P) und nicht entzündeten (N) Arealen der Darmmukosa von MC- und CU-Patienten im Vergleich zur Darmmukosa der Kontrollgruppe mit folgenden Stichprobenmengen (n): Kontrollen: n=5; CU N: n=7; CU P: n=9; MC N: n=14; MC P: n=11. *Kindlin2*: Kontrollen: n=5; CU N: n=4; CU P: n=9; MC N: n=11; MC P: n=10;

Mann-Whitney U Test. Signifikanz: $p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,005$: ***

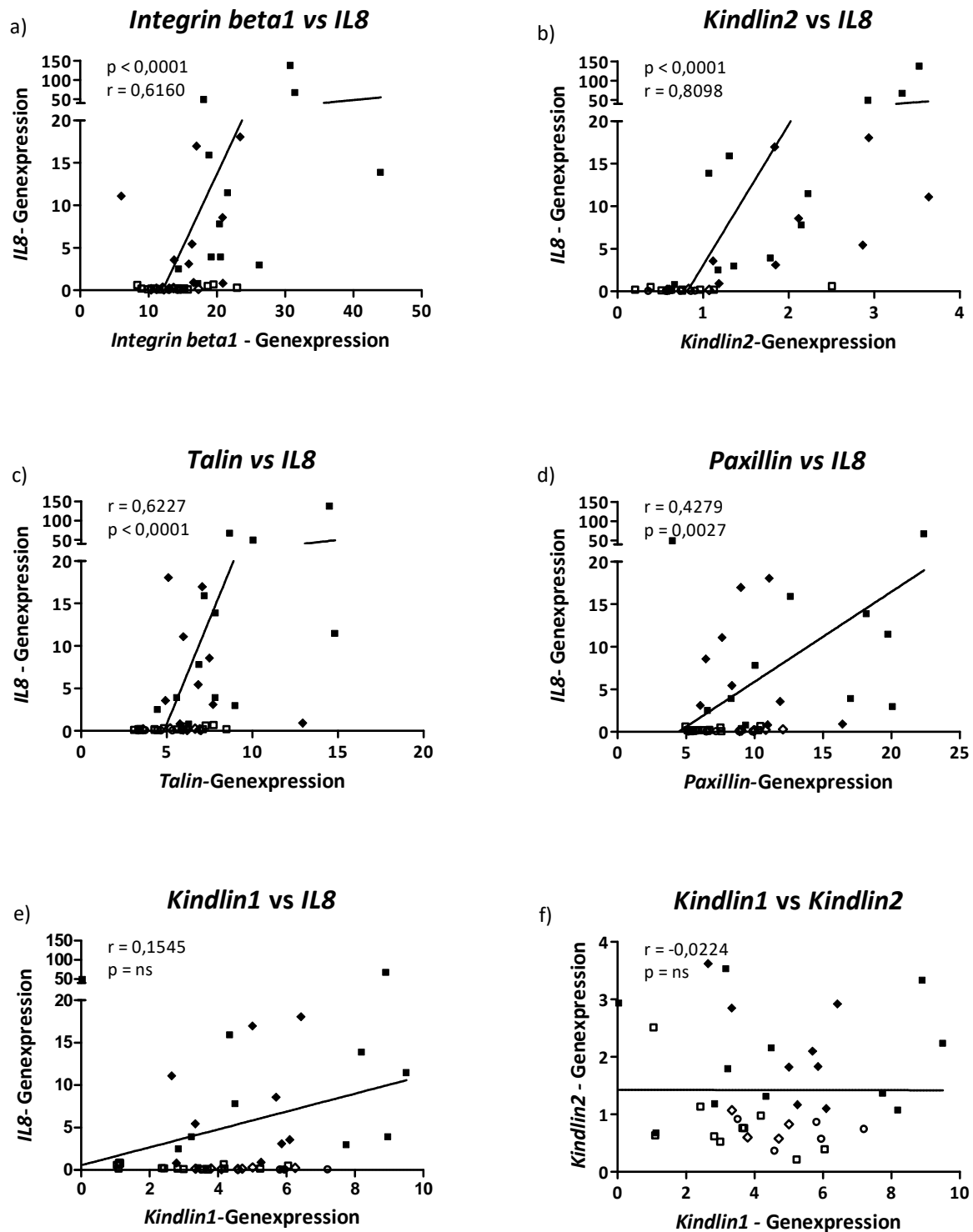


Abbildung 5-2: Korrelationsanalyse mit linearer Regression der Genexpressionen von *Integrin beta1* (a), *Kindlin2* (b), *Talin* (c), *Paxillin* (d) und *Kindlin1* (e) versus *IL8* sowie *Kindlin1* (e) versus *Kindlin2* (f)

Hinsichtlich der mRNA-Synthese zeigt sich ein korrelativer Zusammenhang mit *IL8* bei allen untersuchten Genen mit Ausnahme von *Kindlin1*. Die *Kindlin1*-Expression korreliert auch nicht mit der von *Kindlin2*.

○ = Kontrollen, ◇ = CU N, ◆ = CU P, □ = MC N, ■ = MC P; Spearman Test.

Auch bei *Talin*, dessen Protein in Synergie mit Kindlin1 die Beta1-Integrin Aktivierung vermittelt, zeigte sich ein Expressionsanstieg im entzündeten CED-Gewebe gegenüber der Kontrollgruppe. Nur bei MC war dieser Anstieg auch im Vergleich von entzündetem versus nicht entzündetem Darmgewebe signifikant (Abbildung 5-1e). Auch hier zeigt sich eine positive Korrelation mit der Genexpression von *IL8* (Abbildung 5-2a). Die Expressionsmessung von *Paxillin* (dessen Protein ebenfalls Teil des fokalen Adhäsions-Multiproteinkomplexes ist, jedoch nicht direkt an Kindlin1 oder Integrin bindet, sondern durch Interaktion über die Integrin-linked-kinase (ILK) Zelladhäsions-Signale vermittelt) zeigt weniger deutlich das für *IL8*, *Integrin beta1* und *Kindlin2* beobachtete Muster (Abbildung 5-1f). Die Korrelationsanalyse zeigt jedoch auch hier einen positiven Zusammenhang mit der *IL8*-Expression (Abbildung 5-2d).

Im Gegensatz zu den Genen der anderen untersuchten fokalen Adhäsionsproteine korreliert *Kindlin1* auf Genexpressionsebene nicht mit *IL8* und es zeigt sich auch kein korrelativer Zusammenhang zur Genexpression von *Kindlin2* (Abbildung 5-2).

5.2 Funktioneller Zusammenhang der Genexpression von *Kindlin1* und der seiner Interaktionspartner im Zellkulturmodell

Kindlin1 zeigte im entzündeten Darmepithel der pädiatrischen CED-Patienten, im Gegensatz zu *Kindlin2* und *Integrin beta1*, sowie *Talin* und *Paxillin* bei MC, keinen entzündungsabhängigen Expressionsanstieg. Im Zellkulturmodell wurde untersucht, welche Auswirkungen eine reduzierte *Kindlin1*-Expression, erreicht durch einen *Kindlin1*-Knockdown, auf die Genexpression der untersuchten interagierenden fokalen Adhäsionsproteine hat.

Ein Vorversuch, welcher der Auswahl einer geeigneten Zelllinie mit hoher *Kindlin1*-Grundexpression dienen sollte, gab bereits erste Hinweise. So war *Kindlin1* in der humanen Kolonadenokarzinomzelllinie HT29 im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Zelllinien HTC116 und Caco2 am höchsten exprimiert. Zugleich wiesen HT29 Zellen die geringste Expression von *Kindlin2*, *Integrin beta1*, *Talin* und auch *Paxillin* auf (Abbildung 5-3). Die höchste *IL8*-Expression hingegen wurde wiederum in HT29 Zellen gemessen (Abbildung 5-3). Diese Ergebnisse dokumentieren, dass *Kindlin2*, *Integrin beta1*, *Talin* und *Paxillin* auch in Kolonkarzinomzellen koexprimiert werden, während *Kindlin1* nicht dem gleichen Expressionsmuster folgt. *IL8* hingegen folgt dem Trend der Patientenproben nicht.

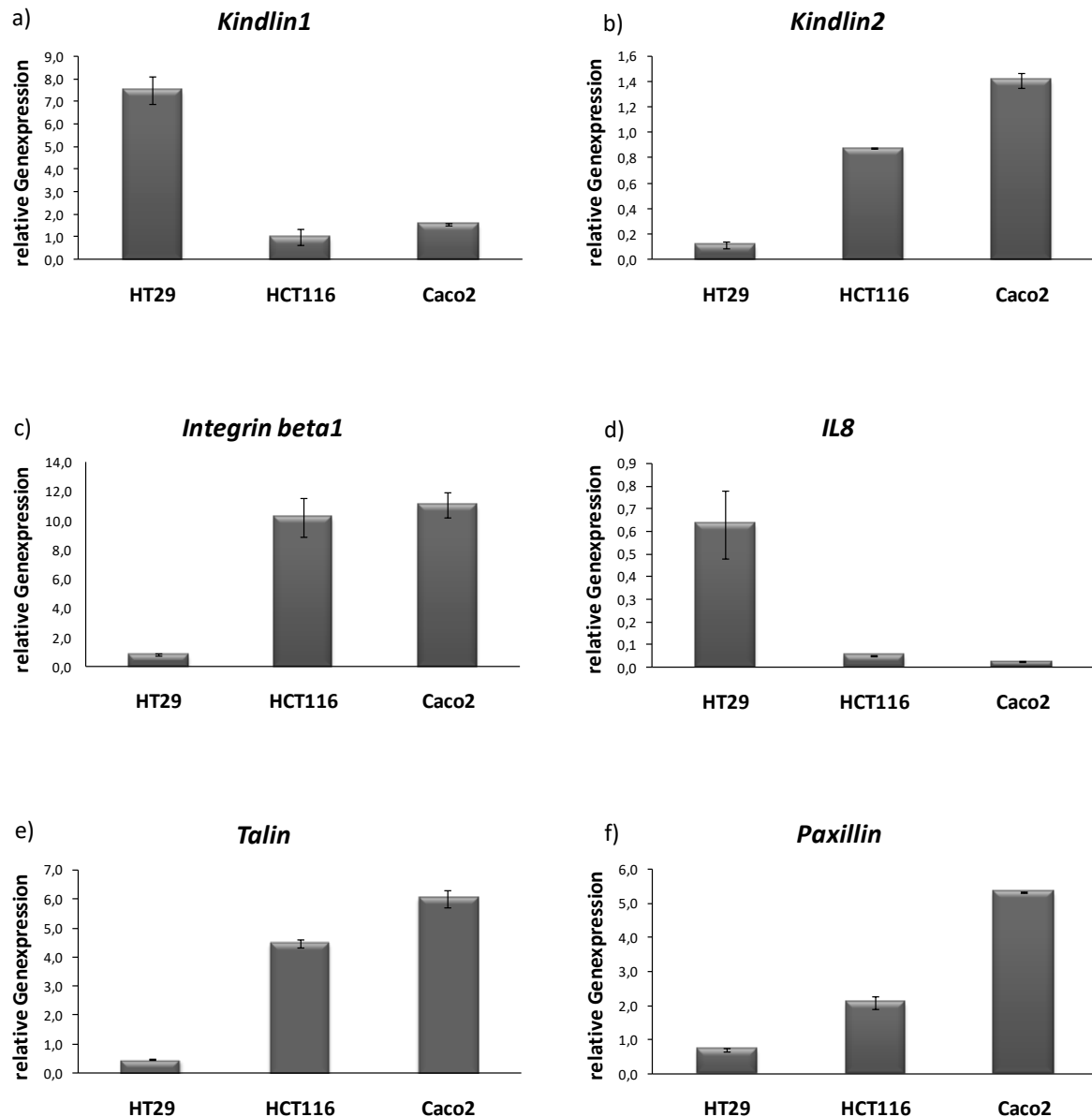


Abbildung 5-3: Vorversuch zur Messung der Genexpression von *Kindlin1* (a), *Kindlin2* (b), *IL8* (c), *Integrin beta1* (d), *Talin* (e) und *Paxillin* (f) in verschiedenen kolorektalen (Adeno)-Karzinomzelllinien

Dargestellt ist die relative Genexpression (*TBP*-normiert) in den kolorektalen Adenokarzinomzelllinien HT29 und Caco2 sowie in der kolorektalen Karzinomzelllinie HCT116.

Die Transfektion von HT29 Zellen, die die höchste *Kindlin1*-Expression zeigten, mit vier verschiedenen siRNAs durch Elektroporation resultierte in einem *Kindlin1*-Knockdown von 70 % bis 80 % ausgehend von der Kontrolltransfektion mit *non-target* siRNA (Abbildung 5-4a). Der *Kindlin1*-Knockdown führte zu einer bis zu 2,85-fachen Steigerung der *Kindlin2*-Expression in den HT29 Zellen (Abbildung 5-4b). Die Genexpression von *IL8*, *Integrin beta1*,

Talin und *Paxillin* hingegen wurde durch *Kindlin1*-Knockdown nicht verändert, obgleich sich hier ein Trend hin zu einer leichten Expressionssteigerung andeutet (Abbildung 5-4c-f).

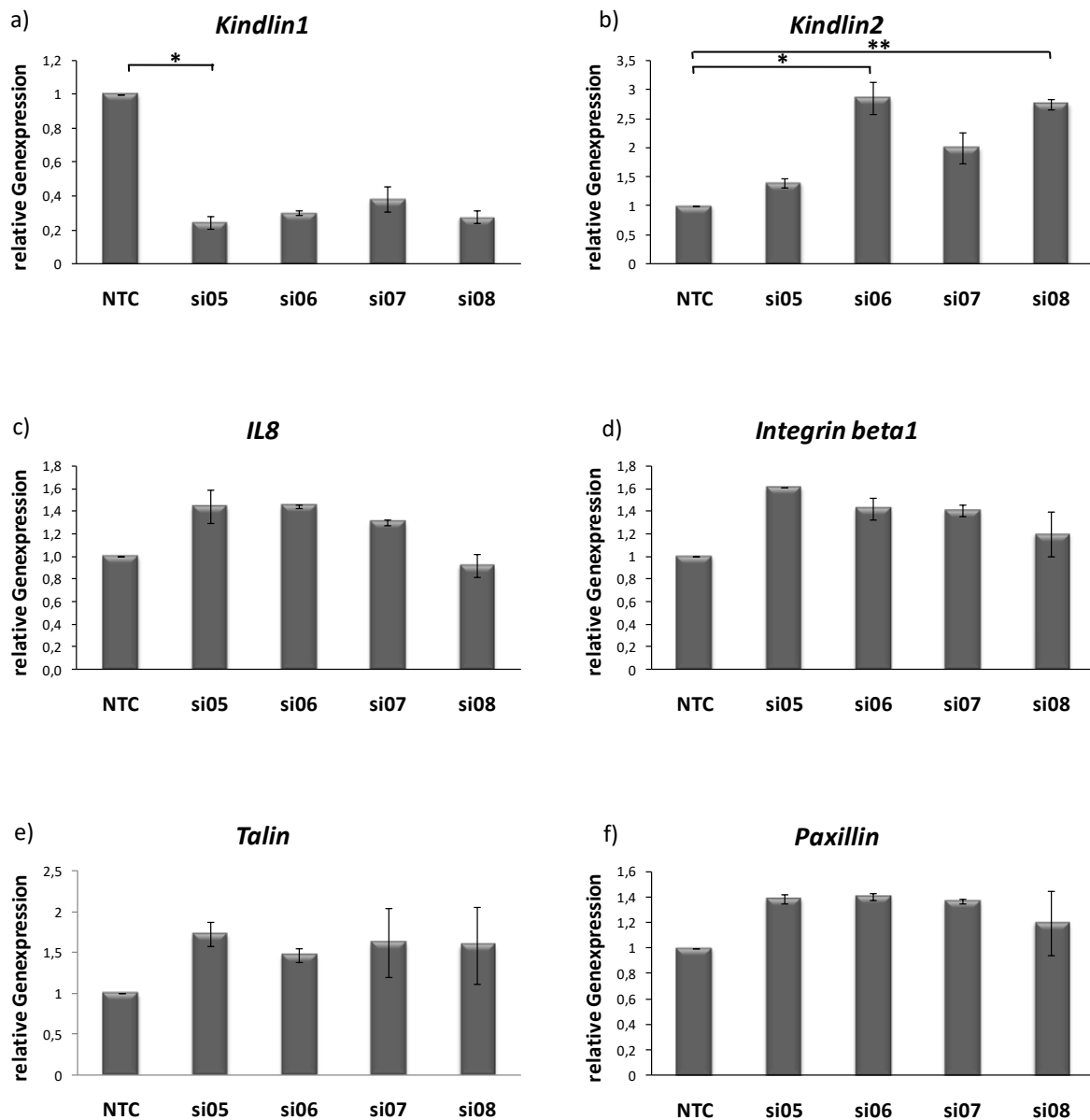


Abbildung 5-4: Genexpression von *Kindlin1* (a), *Kindlin2* (b), *IL8* (c), *Integrin beta1* (d), *Talin* (e) und *Paxillin* (f) in HT29 Zellen nach *Kindlin1*-Knockdown

Dargestellt sind die Genexpressionslevel normalisiert auf den jeweiligen Genexpressionswert in kontrollbehandelten (NTC) Zellen.

6 Ergebnissteil II: Tierexperimenteller Ansatz zur Untersuchung des Einflusses der Gendosis von *Kindlin1* auf das Colitisrisiko

6.1 Genexpression von *Kindlin1*, *Talin*, *Paxillin* und *Integrin beta1* in *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen

Die Hypothese, dass eine geringere *Kindlin1*-Gendosis Einfluss auf das CED-Risiko hat, wurde anhand eines heterozygoten *Kindlin1*-Knockout-Mausmodells überprüft. Hierzu wurde zunächst der Genexpressionsstatus für *Kindlin1* sowie *Talin*, *Paxillin* und *Integrin beta1* im Rektum unbehandelter, 8-10 Wochen alter, *Kindlin1*^{+/-}-Mäuse (+/-) und der ihrer Wildtyp-Geschwister (WT) ermittelt (Abbildung 6-1).

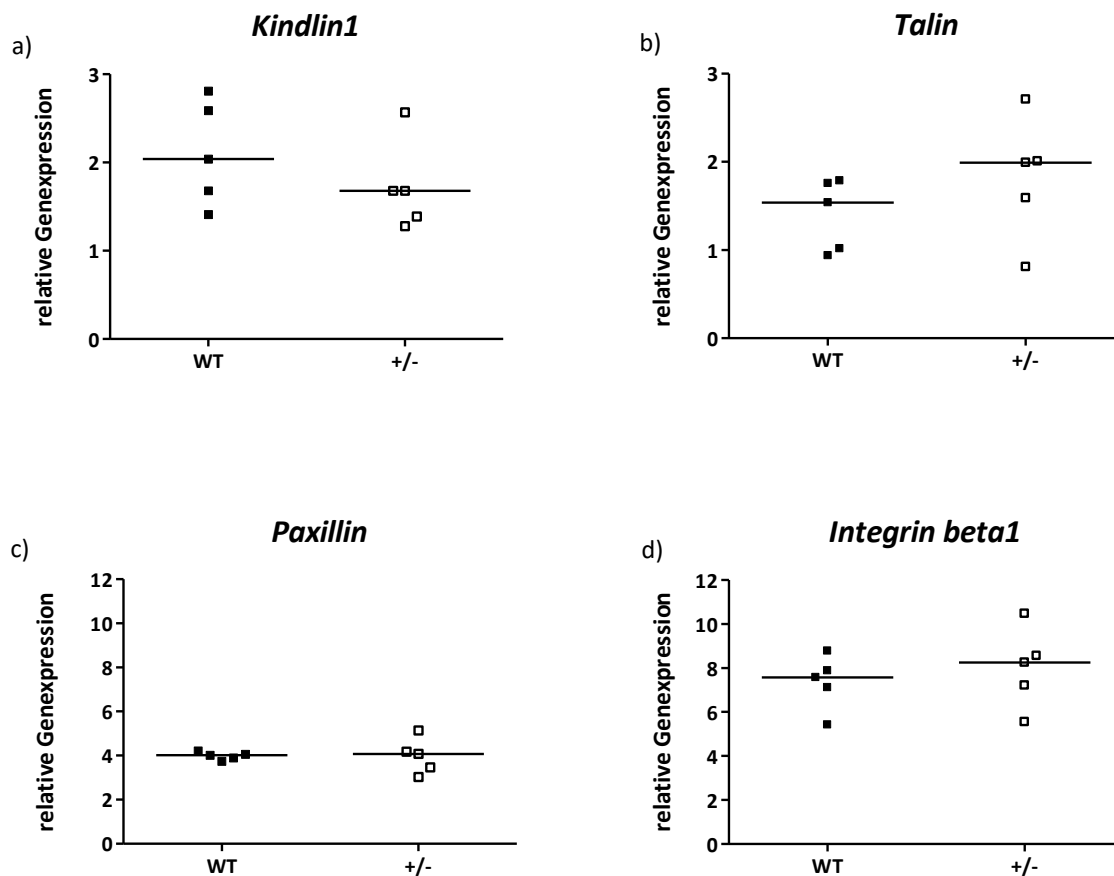


Abbildung 6-1: Genexpression von *Kindlin1* (a), *Talin* (b), *Paxillin* (c) und *Integrin beta1* (d) in unbehandelten *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen (+/-) im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Tieren (WT)

Dargestellt ist die relative Genexpression (*Tbp*-normiert) (Einzelwerte und Median) im rektalen Kolonabschnitt. WT: n=5; +/-: n=5. Mann-Whitney U Test.

Die Genexpressionsanalysen zeigten eine im Median 19 % geringere, jedoch nicht signifikant reduzierte *Kindlin1*-Expression in den untersuchten heterozygoten Tieren im Vergleich zu

den Wildtyp-Geschwistern (Abbildung 6-1a). Analog zu den Beobachtungen im Zellkulturmodell war auch in den heterozygoten Knockout-Tieren die Expression von *Talin* (Abbildung 6-1 b) und *Integrin beta1* (Abbildung 6-1) im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren im Median leicht, jedoch nicht signifikant, erhöht. Bei der *Paxillin*-Expression waren keine Unterschiede zu verzeichnen (Abbildung 6-1). Untersuchungen der Genexpression der Entzündungsmarker Tumornekrosefaktor-alpha (*Tnfa*) (Abbildung 6-2a), Interferon-gamma (*Ifng*) (Abbildung 6-2b), Interleukin-1 β (*Il1b*) (Abbildung 6-2c) und Interleukin-6 (*Il6*) (Abbildung 6-2d) lieferten keinen Hinweis auf eine erhöhte Entzündungsaktivität in einer der beiden Versuchstiergruppen.

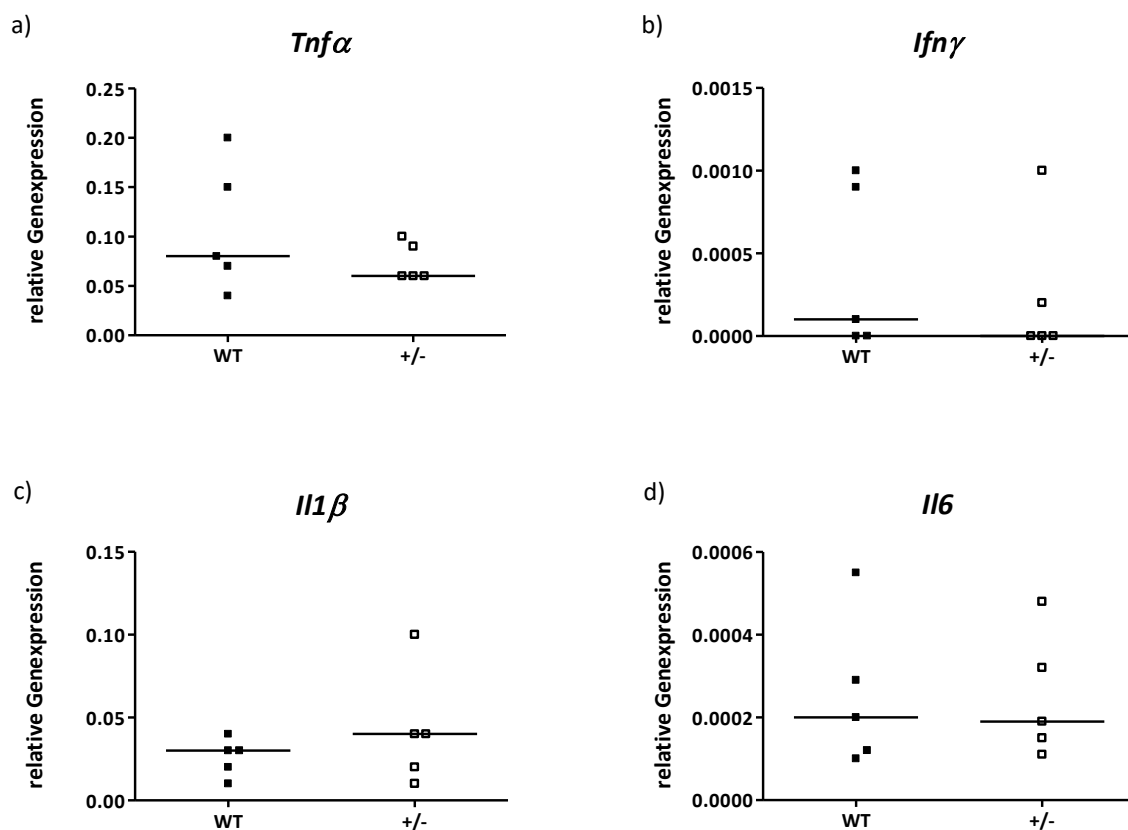


Abbildung 6-2: Genexpression von *Tnfa* (a), *Ifng* (b), *Il1b* (c) und *Il6* (d) in unbehandelten *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen (+/-) und unbehandelten Wildtyp-Tieren (WT)

Dargestellt ist die relative Genexpression (*Tbp*-normiert) (Einzelwerte und Median) im rektalen Kolonabschnitt. WT: n=5; +/-: n=5 Mann-Whitney U Test.

6.2 Auswertung des Natriumdextransulfat-Colitis-Mausmodells

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob sich eine veränderte Colitis-Suszeptibilität der *Kindlin1*^{+/-}-Mäuse bei einer DSS-induzierten Colitis zeigt.

6.2.1 Klinisches Monitoring Teil 1: Auftreten von okkultem sowie sichtbarem Blut im Stuhl der Versuchstiere

Ein Guajak-Test auf okkultes Blut im Stuhl zeigte weder bei den Männchen noch bei den Weibchen Unterschiede zwischen den Wildtyp- und *Kindlin1*^{+/-}-Tieren hinsichtlich des Auftretens von okkultem Blut im Stuhl (Abbildung 6-3).

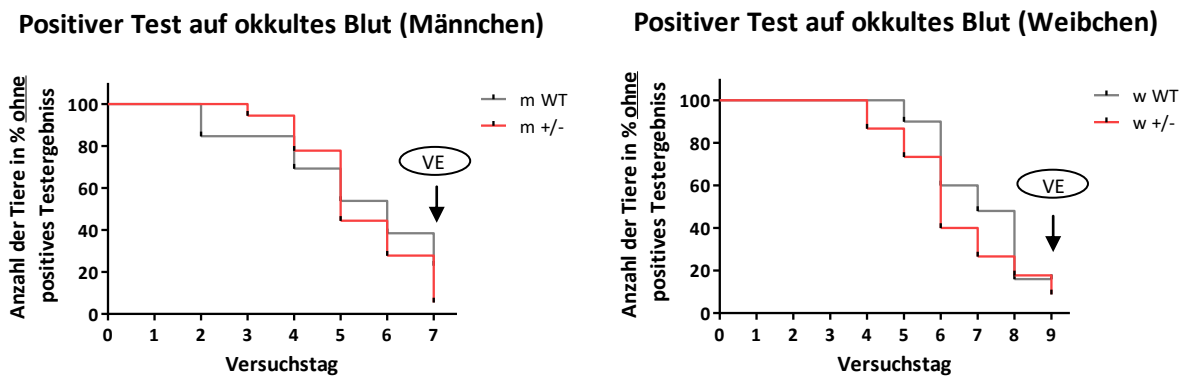


Abbildung 6-3: Kaplan-Meier-Kurven zum Auftreten von okkultem Blut im Stuhl (positiver Test) während DSS-Behandlung

Links ist der Kurvenverlauf für die männlichen, rechts für die weiblichen Versuchstiere dargestellt. VE zeigt das Versuchsende an. m WT: n=13; m +/-: n=18; w WT: n=10; w +/-: n=15; Gehan-Breslow-Wilcoxon Test

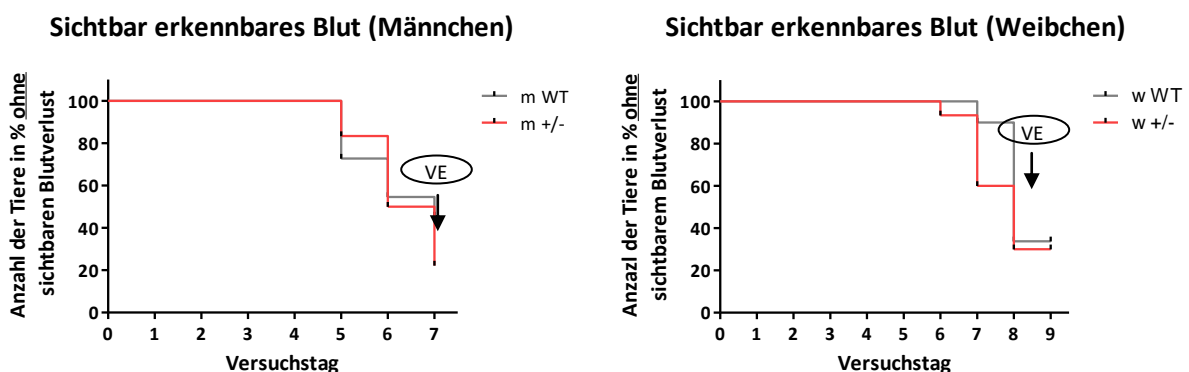


Abbildung 6-4: Kaplan-Meier-Kurven zum Auftreten von sichtbar aufgelagertem Blut auf dem Stuhl oder im Afterbereich der Versuchstiere während DSS-Behandlung

Links ist der Kurvenverlauf für die männlichen, rechts für die weiblichen Versuchstiere dargestellt. VE zeigt das Versuchsende an. m WT: n=11; m +/-: n=18; w WT: n=10; w +/-: n=15; Gehan-Breslow-Wilcoxon Test

Zusätzlich zu dem Test auf okkultes Blut im Stuhl wurde überprüft, ab welchem Zeitpunkt bei den Tieren Blut im Afterbereich oder sichtbar auf dem Stuhl aufgelagert zu erkennen war. Es zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 6-4).

6.2.2 Klinisches Monitoring Teil 2: Gewichtsverlust

Ebenfalls Aufschluss über den Verlauf der Colitis gibt eine mögliche Gewichtsabnahme der Versuchstiere.

Gewichtsveränderung bei Versuchsende

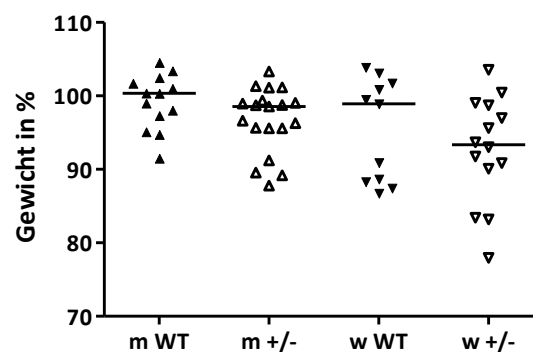


Abbildung 6-5: Gewichtsveränderung (in %) nach DSS-Behandlung im Vergleich zum Ausgangsgewicht (100 %) bei *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen und Wildtyp-Tieren

Dargestellt sind die Messpunkte der einzelnen Individuen sowie die Mediane aus den einzelnen Gruppen. m WT: n=13; m ^{+/-}: n=19; w WT: n=11; w ^{+/-}: n=14. Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test

Die Wildtyp-Tiere sowie die heterozygoten *Kindlin1*-Knockout-Männchen zeigten am Ende des Versuchs im Median keine Gewichtsveränderung (Abbildung 6-5). In der Gruppe der weiblichen heterozygoten Knockout-Mäuse lag der Median mit 93 % deutlich, jedoch nicht signifikant, niedriger und 3 der Tiere nahmen um mehr als 15 % ihres Ausgangsgewichtes ab (Abbildung 6-5).

6.2.3 Klinisches Monitoring Teil 3: Veränderung der Kolonlänge

Neben dem Körpergewicht wurde am Ende des Versuchs auch die Kolonlänge der Versuchstiere gemessen. Bei unbehandelten Tieren fand sich hierbei kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Wildtyp und *Kindlin1*^{+/-}). Abbildung 6-6 zeigt jedoch eine signifikante Verkürzung des Kolons durch DSS-Behandlung in der Wildtyp-Gruppe. Der Median der Kontrollgruppen lag bei beiden Genotypen bei 8 cm. Für die Wildtyp-Gruppe lag

die mittlere lineare Abweichung (\tilde{d}) vom Median bei 0,8 cm, für die *Kindlin1*^{+/-}-Gruppe bei 1,4 cm. Durch die Colitis-Induktion sank der Median der Kolonlänge in der Wildtyp-Gruppe um knapp 19 % auf 6,5 cm ($\tilde{d} = 0,9$ cm) und in der Gruppe der *Kindlin1*^{+/-}-Mäuse um 25 % auf 6 cm ($\tilde{d} = 1,2$ cm).

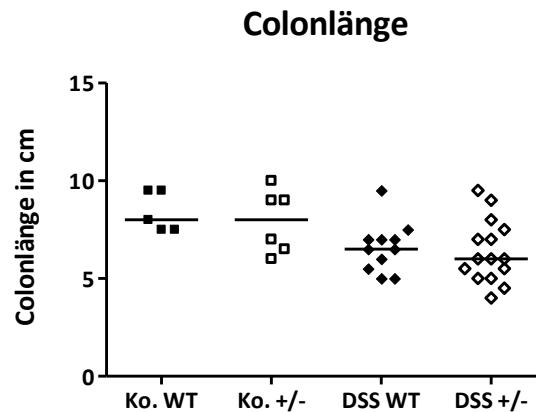


Abbildung 6-6: Vergleich der Kolonlänge von *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen und Wildtyp-Tieren mit und ohne DSS-induzierte Colitis

Dargestellt sind die Messpunkte der einzelnen Individuen sowie die Mediane aus den einzelnen Gruppen mit folgenden Stichprobenmengen: Kontrollen WT: n=5; Kontrollen +/-: n=6; DSS-behandelt WT: n=11; DSS-behandelt +/-: n=15. Kruskal-Wallis Test und Dunn's Multiple Comparison Test.

Aufgrund der großen Datenstreuung, die auch durch Normalisierung auf das Körpergewicht der Mäuse (Daten nicht gezeigt) nicht behoben werden konnte, zeigt sich aber keine signifikante Kolonverkürzung.

6.2.4 Histologische Veränderungen der Darmwand im Rektum

Des Weiteren wurden auch Gewebeschnitte aus dem Rektum der DSS-behandelten Tiere angefertigt, um histologische Veränderungen zu untersuchen.

Ein Vorversuch, in dem das Kolon in vier Abschnitte aufgeteilt und histologisch untersucht worden war, hatte bestätigt, dass der rektale Kolonabschnitt die höchste Relevanz für diese Untersuchungen hat, da dieser am stärksten von der Colitis betroffen war. Die Hematoxylin-Eosin-gefärbten Präparate (Abbildung 6-7) zeigten im proximalen Bereich des Kolons auch nach 7-tägiger DSS-Behandlung eine definierte Kryptenstruktur sowie intakte Mukosa. Weiter distal sind Unregelmäßigkeiten in der Kryptenstruktur und leichte Läsionen der Mukosa zu erkennen. Im nächsten Darmabschnitt werden keine weiteren Mukosaveränderungen deutlich, die Kryptenstruktur hingegen ist leicht angegriffen.

Im distalen Bereich des Kolons sind deutlich Infiltrate sowie Schäden in Kriptenstruktur und Mukosaintegrität erkennbar.

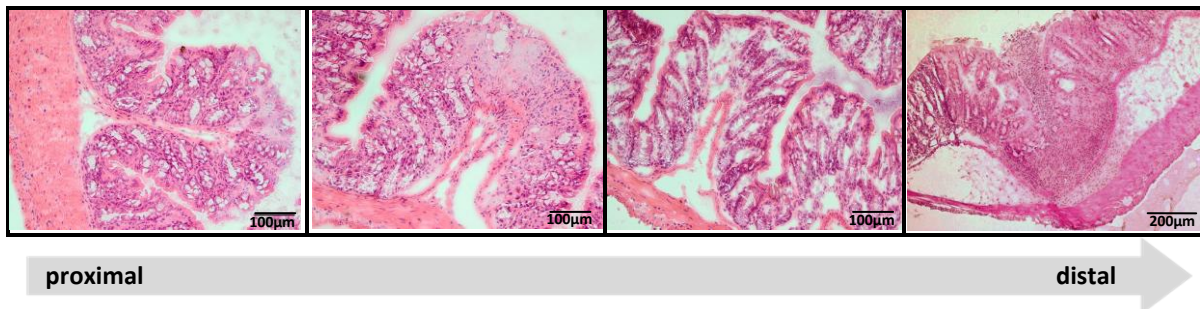


Abbildung 6-7: Repräsentative Darstellung der Hematoxilin-Eosin (HE)-Färbung vierer Kolonabschnitte von proximal nach distal einer DSS-Colitis-Maus

Nach HE-Färbung erscheinen die Zellkerne lila-bläulich und die basophilen Strukturen, wie Zellplasmae, rosa.

Die Auswertung der HE-gefärbten Schnitte ergab keine signifikanten Unterschiede in der Schädigung der Kriptenstruktur zwischen den beiden Versuchstiergruppen. Eine Schädigung der Kriptenstruktur zeigte sich bei 5 von 7 (71%) Wildtyp-Mäusen und bei 11 von 13 (85%) *Kindlin1*-Knockout-Mäusen (Abbildung 6-8 links). Abbildung 6-8 rechts zeigt auch in der Mukosaintegrität keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchstiergruppen nach DSS-Behandlung. 3 von 7 (57%) Wildtyp-Tieren und 6 von 13 (46%) heterozygoten Mäusen wiesen eine Schädigung der Kolonmukosa auf.

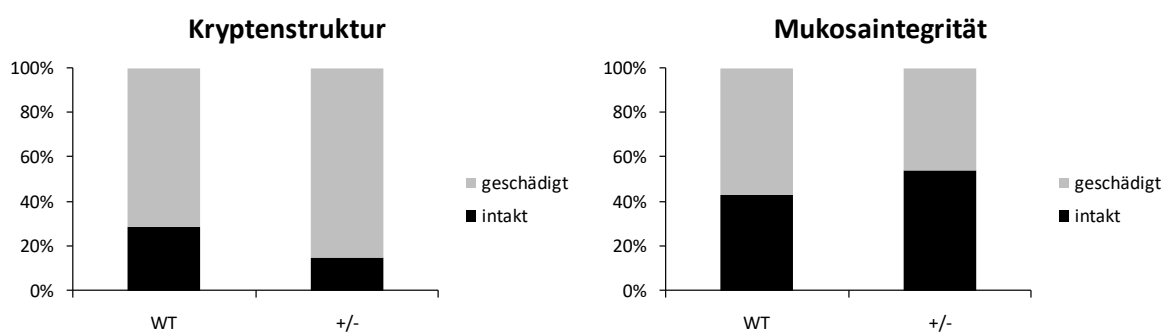


Abbildung 6-8: Histologische Veränderungen der Kriptenstruktur (links) und Mukosaintegrität (rechts) in %
 Dargestellt ist der prozentuale Anteil der DSS-behandelten Tiere, die bei der Auswertung HE-gefärbter Schnitte eine intakte oder geschädigte Kriptenstruktur (links) beziehungsweise intakte oder geschädigte Mukosaintegrität (rechts) zeigten. WT n=7; +/- n=13. Chi-Quadrat Test ohne Korrektur.

Zudem wurde eine *Periodic acid-Schiff* (PAS)-Reaktion an den Gewebsschnitten durchgeführt. Auch hier hatte der Vorversuch im proximalen Abschnitt eine intakte Kryptenstruktur gezeigt. Die Becherzellen waren in diesem Abschnitt gleichmäßig verteilt und die Mukusschicht ebenfalls gleichmäßig. Hin zum distalen Abschnitt wurde die Verteilung der Becherzellen dünner und die Infiltrate, in deren Bereich keine Becherzellen mehr nachweisbar waren, nahmen zu.

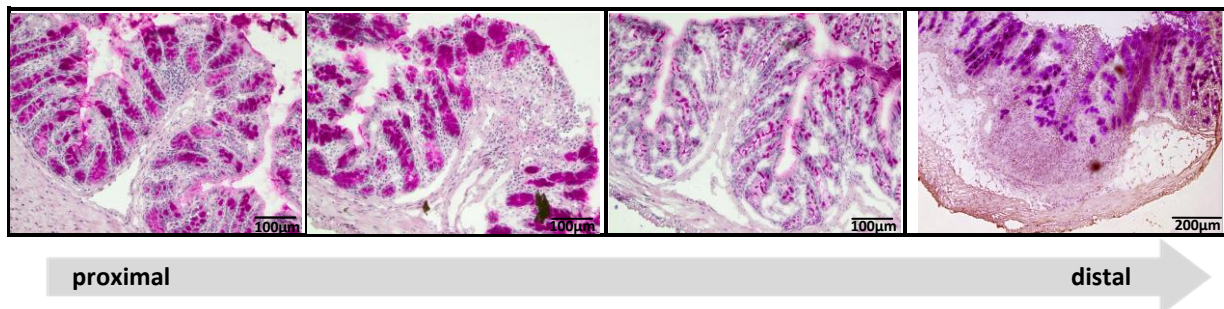


Abbildung 6-9: Repräsentative Darstellung der PAS-Reaktion vierer Kolonabschnitte, von proximal nach distal, einer von DSS-Colitis betroffenen Maus

Auch hier sind die Zellkerne lila-bläulich angefärbt, die Becherzellen und der Mukus erscheinen nach der PAS-Reaktion pink.

Es zeigten sich nur minimale Unterschiede bei der Quantität der Becherzellen, hinsichtlich der Verteilung der Becherzellen jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abbildung 6-10).

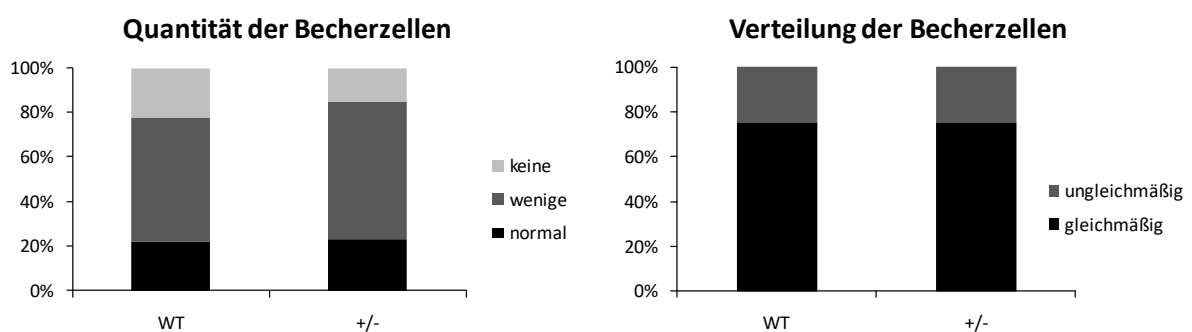


Abbildung 6-10: Quantität (links) und Verteilung der Becherzellen (rechts) bei DSS-behandelten *Kindlin1*^{+/-}-Tieren im Vergleich zu DSS-behandelten WT-Tieren (in %)

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der DSS-behandelten Tiere mit normalen, wenigen oder keinen sichtbaren Becherzellen nach PAS-Reaktion (a) sowie mit gleichmäßiger oder ungleichmäßiger Verteilung der Becherzellen (b). WT n=9; +/- n=13.

6.2.5 Untersuchung der Mukosaveränderungen auf Proteinebene

Um zu untersuchen, ob den beobachteten histologischen Veränderungen der Kolonmukosa auch eine veränderte Apoptoseaktivität zugrunde liegen könnte, erfolgte der Nachweis des Apoptosemarkers *cleaved*-PARP mittels *Western Blot* (Abbildung 6-11).

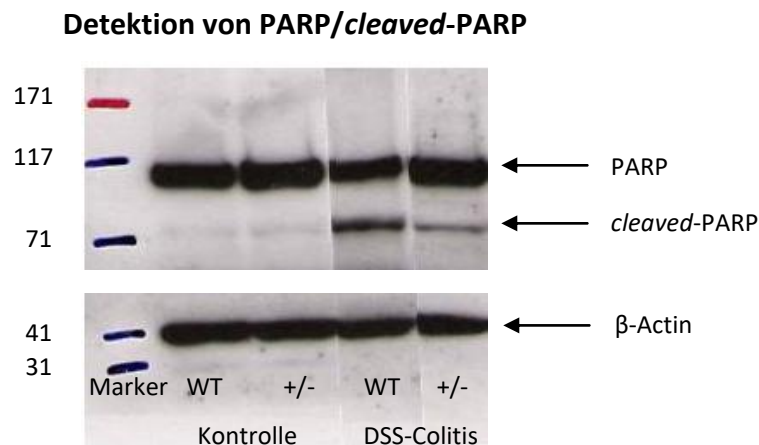


Abbildung 6-11: Proteinnachweis des Apoptosemarkers *cleaved*-PARP mittels *Western Blot*

Die *Western Blot*-Analyse zeigt eine stärkere Bande für *cleaved*-PARP (89 kDa) in DSS-behandelten Mäusen. Die Banden für PARP (116 kDa) und β -Aktin (42 kDa) sind bei allen untersuchten Individuen gleich stark ausgeprägt.

Bei allen untersuchten Proben war die ungespaltene PARP-Bande bei 116 kDa deutlich zu erkennen. Bei den (unbehandelten) Kontrolltieren jedoch war die *cleaved*-PARP-Bande bei 89 kDa kaum sichtbar. Diese Bande war hingegen bei beiden DSS-behandelten Gruppen, sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei den *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen, deutlich detektierbar.

Die durchgeführten *Western Blot*-Analysen deuten auf eine Genotyp-unabhängige Steigerung der Apoptoseaktivität durch eine DSS-induzierte Colitis hin.

6.2.6 Überprüfung des Entzündungsstatus der Versuchstiere auf molekularbiologischer Ebene

Neben dem klinischen Monitoring wurde der Entzündungsstatus der Versuchstiere auch nach DSS-Behandlung mittels Genexpressionsmessungen der Entzündungsmarker *Tnfa*, *Ifng*, *Il1b* und *Il6* molekularbiologisch erfasst. Zum Vergleich sind die bereits unter Punkt 6.1 dargestellten Ergebnisse der unbehandelten Tiere nochmals mit aufgeführt. Abbildung 6-12 zeigt eine signifikante Steigerung der Genexpression von *Tnfa* (a), *Il1b* (c) sowie *Il6* (d) in

behandelten heterozygoten Mäusen im Vergleich zu unbehandelten heterozygoten Tieren. Zwischen den beiden behandelten Versuchstiergruppen (Wildtyp und *Kindlin1*^{+/-}) zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Genexpression der Entzündungsmarker und auch bei der *Ifng*-Expression waren keine signifikanten Veränderungen zu verzeichnen.

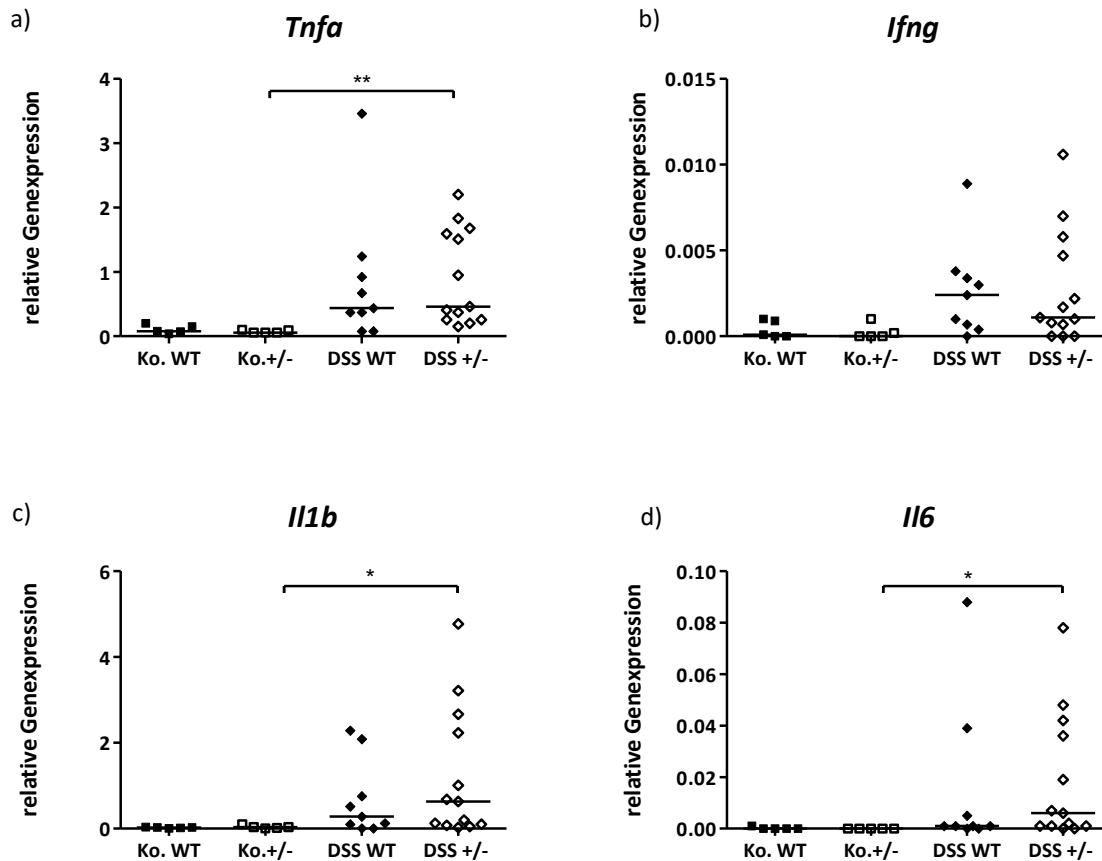


Abbildung 6-12: Genexpression der Entzündungsmarker *Tnfa* (a), *Ifng* (b), *Il1b* (c) und *Il6* (d) im Rektum von *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach DSS-Behandlung (DSS) sowie ohne Behandlung (Ko.)

Dargestellt ist die relative Genexpression (*TBP*-normiert) (Einzeldaten und Median) für WT unbehandelt: n=5; +/- unbehandelt: n=5; WT DSS-behandelt: n=9; +/- DSS-behandelt: n=13. Mann-Whitney U Test. Signifikanzen: p<0,05: *; p<0,01: **

6.3 Molekularbiologische Untersuchung eines möglichen Feedbackmechanismus der induzierten Colitis auf die Expression von *Kindlin1*, *Talin*, *Paxillin* und *Integrin beta1*

Im bisherigen Verlauf der tierexperimentellen Arbeit wurde der Verlust eines *Kindlin1*-Allels stets als Voraussetzung für die Arbeitshypothese und somit als gegebene Größe angenommen. Genexpressionsuntersuchungen nach DSS-Behandlung zeigten aber, dass die

Induktion einer DSS-Colitis auch Auswirkungen auf die Transkription von *Kindlin1* hat. Die Ergebnisse der *real-time* PCR Experimente sind auch hier zum besseren Überblick gemeinsam mit den bereits unter Punkt 6.1 beschriebenen Daten der unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt.

Abbildung 6-13 zeigt keine Veränderung der Expression von *Talin*, *Paxillin* und *Integrin beta1* bei DSS-behandelten versus unbehandelten Tieren, weder bei heterozygoten *Kindlin1*-Knockout-Mäusen, noch bei Wildtyp-Mäusen. Die *Kindlin1*-Expressionslevel fielen jedoch in beiden DSS-behandelten Gruppen stark ab und erreichten annähernd denselben Wert. Der Abfall war dennoch nur in der Gruppe der Wildtyp-Mäuse signifikant, da die *Kindlin1*-Expression in der entsprechenden unbehandelten Gruppe höher lag als bei den unbehandelten *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen.

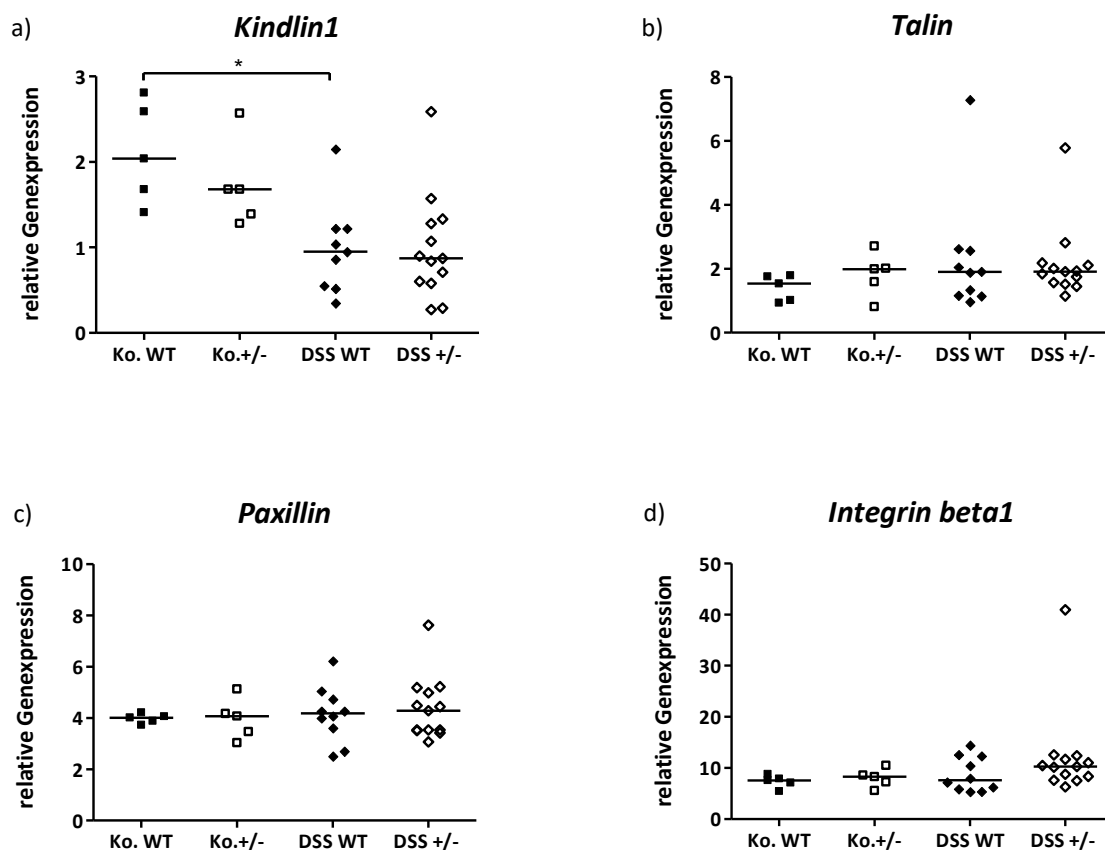


Abbildung 6-13: Genexpression von *Kindlin1* (a), *Talin* (b), *Paxillin* (c) und *Integrin beta1* (d) im Rektum von *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach DSS-Behandlung sowie ohne Behandlung

Dargestellt ist die relative Genexpression (*TBP*-normiert) (Einzeldaten und Median) für WT unbehandelt: n=5; +/- unbehandelt: n=5; WT DSS-behandelt: n=9 ; +/- DSS-behandelt: n=13. Mann-Whitney U Test. Signifikanzen: p<0,05: *; p<0,01: **; p<0,005: ***

7 Diskussion

Für KS-Patienten sind Verläufe mit schwerer gastrointestinaler Symptomatik, ähnlich einer Colitis Ulcerosa, bis hin zu solchen mit völlig unbeeinträchtigtem Gastrointestinaltrakt beschrieben (SADLER ET AL. 2006; KERN ET AL. 2007; LAI-CHEONG ET AL. 2009; HAS ET AL. 2011). Im *Kindlin1*-Knockout-Mausmodell tritt eine fulminant verlaufende Colitis bei allen homozygoten Tieren auf (USSAR ET AL. 2008). In unserer Studie zeigten heterozygote *Kindlin1*^{+/-}-Mäuse primär keine gastrointestinalen Symptome, was sich mit den Beobachtungen von Ussar und Kollegen deckt (USSAR ET AL. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine CED im Kindesalter mit einer verminderten *Kindlin1*-Genexpression im Zusammenhang steht und ob eine geringere *Kindlin1*-Gendosis, bedingt durch einen heterozygoten *Kindlin1*-Knockout, im Mausmodell mit einer erhöhten Colitis-Suszeptibilität bei zusätzlichem Einfluss äußerer Noxen, hier einer Colitis-Induktion mit DSS, einhergeht.

7.1 Veränderte Genexpression der fokalen Adhäsionsproteine bei kindlichen CED-Patienten

In der Literatur gibt es keine Daten zur Genexpression von *Kindlin1* in entzündetem Darmgewebe. Unsere Untersuchungen zeigen weder eine signifikante Reduktion noch eine Steigerung der *Kindlin1*-Expression in der Darmmukosa pädiatrischer CED-Patienten, während die *Kindlin2*- und *Integrin beta1*-Expression entzündungsabhängig ansteigt und positiv mit der *IL8*-Expression korreliert.

Im akuten Schub einer CED mit damit einhergehendem *IL8*-Anstieg zeigt sich also in der untersuchten Patientengruppe eine Genexpressionssteigerung des Kernstückes des fokalen Adhäsionskomplexes Integrin beta1 ebenso wie erhöhte mRNA-Syntheserate der Integrinaktivatoren Kindlin2 und Talin (in MC-Patienten), die für eine tatsächlich stärkere fokale Adhäsion ebenfalls notwendig wäre (HYNES 2002; QIN ET AL. 2004; BANNO ET AL. 2008). Ein entzündungsabhängiger Expressions- und Aktivitätsanstieg der fokalen Adhäsion, in Zusammenhang mit einer Steigerung der Leukozytenadhäsion, im Zuge einer gesteigerten Immunantwort in Endothelzellen ist beschrieben (MEAGER 1999; COOK-MILLS ET AL. 2005; ABRAMS 2013). Möglicherweise greift dieser Mechanismus auch in intestinalen Epithelzellen und die Expressionssteigerung der fokalen Adhäsionsproteine könnte ein Versuch des Körpers sein, die Integrität der intestinalen Barriere im Entzündungsfall zumindest teilweise

zu erhalten. Für diese Hypothese spräche die sehr deutliche Steigerung der *Kindlin2*-Expression im entzündeten Gewebe sowie die Tatsache, dass *Kindlin2* eine Rolle in der Wundheilung spielt (HE ET AL. 2011). Da *Kindlin1* im Darmepithel verstärkt exprimiert wird, wäre demnach auch eine IL8-abhängige Steigerung der *Kindlin1*-Expression zu erwarten (USSAR ET AL. 2006; MALININ ET AL. 2010). Unsere Untersuchungen zeigen dies jedoch nicht. Zwar liegt die *Kindlin1*-Expression im akut entzündeten Darm von CED Patienten im Median über der in nicht entzündeten Arealen von CED-Patienten gemessenen, jedoch überschreiten die Werte im Median nie den der Kontrollgruppe. Die *Kindlin1*-Expression korreliert weder mit der *IL8*- noch mit der *Kindlin2*-Expression.

Ob diese ausbleibende Steigerung der *Kindlin1*-Expression auf Mutationen im *Kindlin1* Gen zurückzuführen ist, ist noch ungeklärt. Denn um mögliche Mutationen ausfindig zu machen, muss eine *Kindlin1*-Sequenzanalyse der untersuchten Patienten durchgeführt werden, da auch in der KS-Diagnostik die Sequenzierung als der Goldstandard gilt (LAI-CHEONG ET AL. 2008). Leider stehen diese Untersuchungen der kooperierenden Arbeitsgruppe zum aktuellen Stand noch aus. So kann auch noch nicht geklärt werden, ob die Auftrennung der Datenpunkte in zwei Datenpunktwolken, die bei der Untersuchung der *Kindlin1*-Expression im Patientenmaterial sichtbar wurde, möglicherweise auf *Kindlin1*-Mutationen zurückzuführen ist.

Ein Blick auf die Expression in verschiedenen Adenokarzinomzelllinien lässt weiterhin einen kompensatorischen Zusammenhang zwischen der *Kindlin1*-Expression und der Expression von *Integrin beta1*, *Kindlin2*, *Talin* und auch *Paxillin* vermuten. Denn die Expressionsanalysen in den Adenokarzinomzelllinien HT29, HCT116 und Caco2 zeigten, dass Zelllinien mit geringerer *Kindlin1*-Expression eine höhere Expression von *Talin*, *Paxillin* und *Integrin beta1* sowie *Kindlin2* aufweisen als Zellen mit höherer *Kindlin1*-Expression. In HT29 Zellen kommt es außerdem nach *Kindlin1*-Knockdown zu einem signifikanten Anstieg der *Kindlin2*-Expression. Dies belegt zum einen die Selektivität der verwendeten si-RNAs, zum anderen macht es deutlich, dass die Mitglieder der Kindlin-Familie *Kindlin1* und *Kindlin2* keineswegs zwingend gleichen Genexpressionsmustern folgen. Obwohl nicht auszuschließen ist, dass es sich bei diesen Ergebnissen um die Folge krebszelleigener Signaltransduktionswege handelt, scheint vor allem *Kindlin2* bei einer Reduktion der *Kindlin1*-Expression hochreguliert zu werden (KAWAI ET AL. 2002; MALININ ET AL. 2010). Zwar zeigen die weiteren untersuchten Gene der fokalen Adhäsionsproteine den gleichen Trend, jedoch nicht signifikant. Für

verschiedenste fokale Adhäsionsproteine sind Kompensationsmechanismen beschrieben (Lo 2006). Aber obwohl sowohl Talin als auch Kindlin2 eine Rolle bei Integrin beta1-Aktivierung spielen, können sie zumindest im Hautepithel von KS-Patienten sowie auch im Darmepithel einiger KS-Fälle und vor allem im Darmepithel neugeborener *Kindlin1*-Knockout-Mäuse den Ausfall von Kindlin1 nicht ausreichend kompensieren. Dies zeigt die KS-Symptomatik im Patienten und das Auftreten der fulminanten Colitis im homozygoten *Kindlin1*-Knockout-Mausmodell (USSAR ET AL. 2006; KERN ET AL. 2007; HAS ET AL. 2008; LAI-CHEONG ET AL. 2009).

7.2 Klinische und histologische Untersuchungen zeigen keine Unterschiede zwischen *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen mit Natriumdextransulfat-induzierter Colitis

Heterozygote *Kindlin1*-Knockout-Mäuse entwickeln sich entgegen den oben genannten *Kindlin1*^{-/-}-Mäusen wie ihre Wildtyp-Geschwister und weisen phänotypisch keine Anzeichen einer spontan auftretenden Colitis auf. Daraus ergibt sich die Möglichkeit zu untersuchen, ob Individuen mit einer geringeren *Kindlin1*-Gen dosis sensitiver auf eine Colitis-Induktion reagieren.

Im klinischen Monitoring zeigt sich eine induzierte Colitis im Mausmodell unter anderem durch Gewichtsverlust sowie Blutverlust über den Darm (WIRTZ ET AL. 2007). Nach erfolgreicher Induktion einer akuten DSS-Colitis, belegt durch den signifikanten Anstieg des Entzündungsmarkers *Tnfa*, wurden in unseren Untersuchungen keine eindeutigen Differenzen bezüglich Gewichts- und Blutverlust zwischen den *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen deutlich. Zwar gab es unter den heterozygoten weiblichen Tieren Individuen mit sehr deutlichem Gewichtsverlust, jedoch wiesen die Daten eine sehr starke Streuung auf, die durch die getrennte Auswertung der Geschlechter noch verstärkt wurde. Grund für die getrennte Auswertung der beiden Geschlechter war die Tatsache, dass sich die Colitis bei den männlichen Tieren deutlich schneller entwickelte. So wurde die Versuchsdauer für diese Gruppe auf 7 Tage reduziert, um zu vermeiden, dass ein Großteil der Tiere aus ethischen Gründen verfrüht aus dem Versuch genommen werden musste. Warum sich die Symptome bei den Männchen schneller und ausgeprägter zeigen, bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung ist die höhere tägliche Flüssigkeitsaufnahme der männlichen Tiere während des Versuchs (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend ist auch die absolute tägliche DSS-Dosis bei den Männchen höher als bei den Weibchen. Egger et al. beschreiben allerdings, dass eine inverse Korrelation zwischen dem Schweregrad der Colitis-Symptomatik

und der absoluten DSS-Aufnahme über das Trinkwasser bei einer Konzentration von 2,5 % DSS besteht und begründen dies mit einer höheren Trinkmenge von robusteren Tieren, die demnach auch langsamer auf die Colitis-Induktion reagierten (EGGER ET AL. 2000). Hierbei wurden die Tiere jedoch nicht nach Geschlechtern getrennt ausgewertet und alle Tiere blieben maximal 7 Tage im Versuch. So bleibt fraglich und näher zu beleuchten, ob eine Reduktion der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme Grund für den höheren Gewichtsverlust und zugleich die verzögerte Colitis-Induktion bei den Weibchen ist. Denkbar wäre auch, dass die weiblichen C57BL/6-Mäuse grundsätzlich schwächer auf eine DSS-Colitis-Induktion reagieren, wie es auch eine Forschungsgruppe der Michigan State University für die Colitis-Induktion mit *Helicobacter hepaticus* zeigen konnte (IRWIN ET AL. 2013).

Auf histologischer Ebene gibt es ebenfalls keinen Hinweis auf einen stärkeren Colitisverlauf in einer der beiden Versuchsgruppen. Die Schädigung von Kryptenstruktur und Mukosa, wie sie für CED-Patienten ebenso wie für Mäuse mit induzierter DSS-Colitis beschrieben ist, und die Verteilung der Becherzellen hielt sich in beiden Gruppe die Waage (KERN ET AL. 2007; CORNAGGIA ET AL. 2011; PERSE ET AL. 2012). Auch kam es in beiden Versuchstiergruppen in ähnlichem Ausmaß zu einer Reduktion der Becherzellen durch die DSS-induzierte Colitis. Diese Reduktion ist sowohl für eine murine Colitis, als auch für Colitis Ulcerosa im Menschen beschrieben und führt zu einer weiteren Schädigung der intestinalen Barriere durch Beeinträchtigung der Mukusschicht (BOIRIVANT ET AL. 1998; GERSEMAN ET AL. 2009). Darüber hinaus scheinen die Becherzellen auch eine Rolle als Vermittler von (Nahrungs-)Antigenen zu den dendritischen Zellen zu spielen und so mitverantwortlich für die Homöostase des intestinalen Immunsystems zu sein (McDOLE ET AL. 2012).

Entgegen unserer Hypothese führte der Knockout eines einzelnen *Kindlin1*-Allels im angewendeten Mausmodell zu keiner im klinischen Monitoring oder histologisch messbaren erhöhten Empfindlichkeit gegenüber einer induzierten Colitis. Vielmehr zeigte sich, dass der Effekt der Colitis-Induktion auf die gemessenen Parameter stärker war als der des Genotyps.

7.3 Genexpressionsanalysen geben Hinweis auf gleiche Colitis-Suszeptibilität der beiden Versuchstiergruppen

Auch die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen, die nur eine um 25 % geringere *Kindlin1*-Expression und keine erhöhte *Tnfa*, *Ifng* *Il6*, und *Il1b*-Expression in den unbehandelten

Kindlin1^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zeigen, spiegeln sich in dem von uns beobachteten Phänotyp wider.

Die Ergebnisse der Genexpressionsmessung der Entzündungsmarker nach DSS-Behandlung sind nicht ganz eindeutig zu beurteilen. Zwar ist der Anstieg der Entzündungsmarker *Tnfa*, *Il1b* und *Il6* nach DSS-Behandlung nur für die heterozygoten Versuchstiere signifikant, jedoch ist dieser Trend auch für die behandelten Wildtyp-Tiere zu erkennen und es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchstiergruppen. Offensichtlich scheint auch hier der Einfluss der Colitis-Induktion höher zu sein als der des Genotyps. Klarer untersuchen ließe sich dies möglicherweise mit täglichen Blutentnahmen und entsprechender Genexpressionsanalyse. Dies war jedoch in dem vorliegenden Tierversuchsantrag nicht vorgesehen.

7.4 Reduktion der *Kindlin1*-Expression im murinen Tiermodell bei akuter Entzündung

Weiterhin zeigte sich im Mausmodell nach erfolgreicher DSS-Colitis-Induktion, im Gegensatz zu den Humandaten, keine Veränderung der Expression von *Integrin beta1* und *Talin* im akuten Entzündungszustand (ROGLER ET AL. 1998; YAN ET AL. 2009). Die *Paxillin*-Expression war ebenfalls nicht verändert. Über die *Kindlin2*-Expression kann aufgrund der begrenzten Probenmenge leider keine Aussage getroffen werden. Die *Kindlin1*-Expression war während der akuten Colitis jedoch deutlich reduziert und fiel trotz unterschiedlicher Ausgangswerte, in sowohl der DSS-behandelten Wildtyp- als auch der DSS-behandelten *Kindlin1*^{+/-}-Gruppe auf etwa den gleichen Wert ab.

Sowohl bei den von Colitis betroffenen Mäusen, als auch bei den CED-Patienten lag die *Kindlin1*-Genexpression also im Median unter der der Kontrollgruppe. Allerdings war die Expression im akuten Entzündungsstadium der Patienten in der Tendenz höher als im nicht entzündeten Gewebe, während die *Kindlin1*-Expression im Tierversuch nach Colitis-Induktion geringer war. Daraus ergibt sich ein Widerspruch, der nicht durch die methodischen Unterschiede in der Aufarbeitung der Proben erklärt werden kann. Beim humanen Probenmaterial handelte es sich um Schleimhautbiopsien (Mukosa und Submukosa), während die untersuchte RNA im Mausmodell nur aus Darmresektaten gewonnen werden konnte, die alle Wandschichten enthielten. Die Tatsache, dass *Kindlin1* primär in Epithelzellen exprimiert wird, lässt aber darauf schließen, dass die Aufarbeitung des Darmresektates in den Kontroll- gleichermaßen wie in den DSS-behandelten Tieren allenfalls

zu einer allgemein geringeren *Kindlin1*-mRNA-Konzentration geführt hätte (SIEGEL ET AL. 2003).

Ein weiterer experimenteller Unterschied bestand darin, dass es sich im Tiermodell um den vollständigen Verlust eines *Kindlin1*-Allels handelt, da die neomycinresistente Kassetten direkt in das, das Startcodon enthaltende, Exon 2 eingeschoben worden war (USSAR ET AL. 2008). In KS-Patienten wurden hingegen bislang bereits 46 biallelische Mutationen identifiziert, darunter auch *compound* heterozygote, die alle durch einen Translationsabbruch zum kompletten Verlust der Proteinfunktion führen (LAI-CHEONG ET AL. 2010; TECHANUKUL ET AL. 2011). Entsprechend könnten aber die von uns verwendeten Primer auch mRNA-Transkripte detektiert haben, die mutiert und folglich nicht translatiert werden oder eine unvollständige Proteinsynthese zur Folge haben. Solche Befunde wurden auch in Keratinozyten von KS-Patienten beschrieben. Außerdem wurden in Kolonkarzinomzellen *Kindlin1*-Transkripte mit einer Länge von 58 kb und 43 kDa schwere *Kindlin1*-Isoformen gefunden, deren Funktion bislang noch ungeklärt ist (SIEGEL ET AL. 2003; KERN ET AL. 2007; HAS ET AL. 2008).

Der direkte Einfluss von DSS scheint auch nicht verantwortlich für die reduzierte *Kindlin1*-Expression nach DSS-Behandlung zu sein. Zwar ist DSS dafür bekannt, dass es auch die intestinale Barriere, speziell die *tight junctions*, angreift, ob DSS jedoch auch direkten Einfluss auf die fokale Adhäsion nimmt, ist zum derzeitigen Stand noch ungeklärt (LAROUÏ ET AL. 2012). Dagegen spricht, dass sich keine Veränderungen in der Genexpression von *Talin*, *Paxillin* und *Integrin beta1* zeigten. Diese unveränderte Genexpression spricht auch gegen die Überlegung, dass ein zu starker Epithelverlust Grund für die reduzierte *Kindlin1*-Konzentration in DSS-behandelten Tieren ist.

Die Kompensation des gesunden *Kindlin1*-Allels im Mausmodell scheint so stark zu sein, dass sich keine Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit auf eine DSS-Colitis-Induktion zwischen den beiden Versuchstiergruppen zeigen. Es kommt aber im Tiermodell durch Induktion einer DSS-Colitis zu einer signifikanten Reduktion der *Kindlin1*-Expression.

7.5 Hinweise auf mögliche adhäsionsunabhängige Kindlin1-Funktionen bei der Natriumdextransulfat-induzierten Colitis im Mausmodell

Die Tatsache, dass die Genexpression von *Talin*, *Paxillin* und *Integrin beta1* nach Colitis-Induktion unverändert bleibt, die *Kindlin1*-Expression aber signifikant sinkt, deutet darauf hin, dass *Kindlin1* hier auch eine adhäsionsunabhängige Funktion haben könnte. Diese

könnte im Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg stehen, denn in Keratinozyten kommt es durch den Verlust von Kindlin1, Integrin-unabhängig, zu erhöhtem Wnt- β -Catenin-Signaling (ROGNONI ET AL. 2014). Da der Wnt-Signalweg in sowohl murinem als auch humanem intestinalen Gewebe einen hohen Stellenwert einnimmt, könnte diese Funktion von Kindlin1 auch im Darm eine Rolle spielen (CLEVERS 2006; FEVR ET AL. 2007; KONSAVAGE ET AL. 2012). Eine Überaktivierung des Wnt-Signalwegs kann zu malignen Veränderungen führen, während eine Blockierung dieses Signaltransduktionsweges in einem Verlust der Kryptenstruktur resultiert (SURAWEERA ET AL. 2006; FEVR ET AL. 2007; NAJDI ET AL. 2011). Des Weiteren scheint ein aktivierter Wnt-Signalweg zur Bildung von malignen kolorektalen Veränderungen bei CU-Patienten beizutragen (VAN DEKKEN ET AL. 2007; CLAESSEN ET AL. 2010). Andererseits berichten Malinin und Kollegen wiederum von einer gesteigerten *Kindlin1*-Expression in Kolonkarzinomen (MALININ ET AL. 2010).

7.6 Erhöhte intestinale Apoptoserate nach Colitis-Induktion im Mausmodell

Für Kindlin1-defiziente Keratinozyten ist eine Apoptosesteigerung beschrieben (HERZ ET AL. 2006). Ussar und Kollegen konnten jedoch nur im abgelösten Darmepithel von *Kindlin1*^{-/-}-Mäusen eine gesteigerte Apoptoserate zeigen, während die Apoptose im adhären Epithel der Wildtyp-Tiere entsprach (Ussar et al. 2008). Die im Rahmen unserer Arbeit durchgeführten *Western Blot*-Analysen des Apoptosemarkers PARP, der im Zuge der Apoptosekaskade zu *cleaved*-PARP gespalten wird, ließen keine unterschiedlichen Apoptoseraten zwischen den unbehandelten, heterozygoten *Kindlin1*-Knockout-Mäusen und den unbehandelten Wildtyp-Tieren erkennen (DURIEZ ET AL. 1997). Es zeigte sich aber eine verstärkte Apoptose nach Colitis-Induktion in beiden Gruppen, für die Wildtyp-Tiere sogar etwas deutlicher als für die *Kindlin1*^{+/-}-Mäuse.

Die Untersuchungen der Apoptoserate zeigen ebenfalls den stärkeren Beitrag der Colitis-Induktion im Gegensatz zum Genotyp. Eine Apoptosesteigerung durch DSS im Mausmodell ist bereits gezeigt und scheint vor allem in der akuten Phase der Colitis für den Verlust der intestinalen Barriere und die darauf folgende Chronifizierung der Colitis mitverantwortlich zu sein (ARAKI ET AL. 2010). Des Weiteren entsprechen die Ergebnisse im DSS-Colitis-Mausmodell einer ebenfalls stärkeren apoptotischen Aktivität im Epithel von CU-Patienten (LAUKOETTER ET AL. 2008).

7.7 Experimenteller Ausblick

Das von uns durchgeführte DSS-Modell simuliert eine akute Darminflammation, was sich in einem Anstieg der Entzündungsmarker *Il1b*, *Il6*, *Tnfa* und *Ifng* widerspiegelt (EGGER ET AL. 2000; ALEX ET AL. 2009). Bei der Anwendung eines Tiermodells ist nie auszuschließen, dass die Ergebnisse nicht auf den menschlichen Organismus zutreffen, wenngleich das DSS-Modell ein etabliertes Modell für CED ist (OKAYASU ET AL. 1990; PERSE ET AL. 2012). Des Weiteren könnten in akut entzündetem Gewebe von CED-Patienten fortgeschrittene Veränderungen durch die chronische Erkrankung vorliegen, welche in unserem Modell nicht erfasst werden. Für die DSS-Colitis in der Maus sind unterschiedliche Zytokinmuster bei akuter und chronischer Form der Colitis beschrieben, die erst im chronischen Stadium vom Th1/Th17-vermittelten zu dem der CU ähnlichen Th2-vermittelten Muster wechseln (ALEX ET AL. 2009). Zur Überprüfung dieser Überlegungen könnte die Durchführung eines chronischen DSS-Colitis-Modells beitragen, bei dem die Tiere in Intervallen abwechselnd DSS-angereichertes Wasser und reines Trinkwasser erhalten (TANAKA ET AL. 2003; PERSE ET AL. 2012). Außerdem wäre im Weiteren die Durchführung eines TNBS-Modells (Trinitrobenzensulfonsäure-Modell) hilfreich, bei welchem eine Colitis ähnlich des MC induziert wird. Eine bessere Übertragbarkeit auf die MC-Daten könnte somit gewährleistet werden.

Hinsichtlich der Humandaten stand für unsere Untersuchungen mit ein bis zwei Darmbiopsien pro Patient nur eine sehr geringe Probenmenge zur Verfügung, die sofort nach der Entnahme schockgefroren werden musste. Deshalb beschränken sich unsere Messungen auf die Genexpression und es können zum aktuellen Zeitpunkt keine Aussagen über Proteinexpression oder Proteinaktivierung und Colokalisation getroffen werden. Außerdem wurden die Untersuchungen durch die Tatsache limitiert, dass im klinischen Alltag Biopsie-Entnahmen an Kindern ohne entzündliche Veränderungen der Darmschleimhaut sehr selten sind. Trotz dieser Schwierigkeit standen für unsere Untersuchungen letztlich fünf Kontrollproben zur Verfügung. Durch eine höhere Stichprobenmenge, sowohl bei den Kontrollen als auch den CED-Patienten, und eine größere Probenmenge könnte zum einen die Datenstreuung reduziert werden, zum anderen könnten Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt werden. Außerdem könnte die Analyse der *Kindlin1*-Expression in CED-Patienten mit Hautsymptomatik, ebenso wie die Rekrutierung von heterozygoten *Kindlin1*-Mutations-Trägern interessante Ergebnisse liefern.

8 Zusammenfassung

Eine homozygoter *Kindlin1*-Knockout führt im Mausmodell wenige Tage nach der Geburt zu einer letal verlaufenden Colitis und auch bei Patienten mit Kindler Syndrom sind Verläufe mit gastrointestinaler Symptomatik ähnlich einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob in pädiatrischen CED-Patienten eine reduzierte *Kindlin1*-Expression vorliegt und ob eine geringere *Kindlin1*-Gendosis aufgrund eines heterozygoten *Kindlin1*-Knockouts (*Kindlin1*^{+/-}) eine erhöhte Suszeptibilität für eine induzierte Colitis bedingt.

Genexpressionsanalysen, die an Kolonbiopsien von pädiatrischen CED-Patienten aus entzündeten und nicht entzündeten Darmabschnitten durchgeführt wurden, zeigen im Vergleich zu Kolonbiopsien von Kindern ohne CED (Kontrollgruppe) keine signifikante Reduktion der *Kindlin1*-Expression. Es kommt jedoch auch zu keiner Expressionssteigerung von *Kindlin1*, während *Kindlin2* und die Gene der *Kindlin1*-assoziierten fokalen Adhäsionsproteine Integrin beta1 und Talin im entzündeten Darm der CED-Patienten eine erhöhte mRNA-Syntheserate aufweisen. Es besteht demnach keine Korrelation zwischen der *Kindlin1*-Expression und der Expression von *IL8* in der Darmmukosa der untersuchten CED-Patienten. Genexpressionsanalysen in drei verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien zeigen jedoch eine Steigerung von *Integrin beta1*, *Talin* sowie insbesondere *Kindlin2* nach *Kindlin1*-Knockdown und deuten somit auf eine kompensatorische Regulation hin.

Heterozygote *Kindlin1*-Knockout-Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine erhöhte Empfindlichkeit für die Entwicklung einer durch DSS induzierten Colitis. Auf klinischer (Blutverlust über den Darm und Gewichtsverlust), histologischer (Veränderungen der Kryptenstruktur, Mukosa und Becherzellverteilung sowie Kolonverkürzung) sowie molekularbiologischer Ebene (Genexpression der Entzündungsmarker *Il1b*, *Il6*, *Tnfa* und *Ifng*) gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen DSS-behandelten *Kindlin1*^{+/-}-Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistern. Dies ist auch für die in Darmproteinlysaten gemessene Apoptoserate der Fall. In allen untersuchten Parametern zeigt die DSS-Colitis-Induktion einen deutlicheren Effekt als der Genotyp. Sie zieht in der Wildtyp-Gruppe sogar eine, bislang noch ungeklärte, signifikante Reduktion der *Kindlin1*-Expression selbst nach sich und auch bei den heterozygoten *Kindlin1*-Mäusen fällt die *Kindlin1*-Expression auf das selbe Level ab. Die Tatsache, dass im Gegensatz dazu die Expression von *Integrin beta1*, *Talin* und *Paxillin* durch die DSS-Behandlung unverändert bleibt zeigt, dass *Kindlin1* auch im akuten

DSS-Colitis-Modell in der Maus eine Sonderposition unter den fokalen Adhäsionsproteinen einnimmt. Wie auch in den untersuchten CED-Darmbiopsien und im Zellkulturmodell folgt die *Kindlin1*-Expression nicht dem Expressionsmuster der direkt mit Kindlin1 assoziierten Proteine Integrin beta1 und Talin sowie Kindlin2. Es könnte hier eine adhäsionsunabhängige Funktion von Kindlin1, möglicherweise im Rahmen der Signaltransduktion, im Vordergrund stehen. Eine Möglichkeit könnte hierbei auch der bereits gezeigte Einfluss von *Kindlin1* auf das Wnt-Signalweg sein.

Die Hypothese einer reduzierten *Kindlin1*-Expression in der Darmmukosa pädiatrischer CED-Patienten und einer erhöhten Empfindlichkeit heterozygoter *Kindlin1*-Knockout-Mäuse auf eine DSS-Induzierte Colitis wird in dieser Arbeit widerlegt. Die möglicherweise fehlende Steigerung der *Kindlin1*-Expression in der Darmmukosa pädiatrischer CED Patienten sowie die reduzierte *Kindlin1*-Expression im akuten DSS-Colitis-Modell in der Maus deuten aber auf einen bisher noch ungeklärten Zusammenhang zwischen chronischen sowie akuten Entzündungen des Darmes und *Kindlin1* hin.

9 Abkürzungsverzeichnis

AJ	<i>Adherens Junctions</i>
bp	Basenpaar
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CI	Colitis Indeterminata
CU	Colitis Ulcerosa
\bar{x}	mittlere lineare Abweichung vom Median
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextran-Natrium-Sulfat / Natrium-Dextransulfat
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FA	Fokale Adhäsion
FAK	Fokale-Adhäsions-Kinase
FERM	4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase
Ifng	murines Interferon-gamma
Il1 β	murines Interleukin-1-beta
Il6	murines Interleukin-6
IL8	humanes Interleukin-8
ILK	Integrin-like-Kinase
k.A.	keine Angaben
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrolle
KS	Kindler Syndrom
MAC1	Makrophage-1-Antigen
MC	Morbus Crohn
N	nicht entzündetes Darmgewebe
N	Stichprobenmenge
NTC	Non-target-controll / Negativkontrolle
P	entzündetes Darmgewebe
p	Signifikanzwert
PAS	Periodic acid-Schiff
PH	Pleckstrin Homologie

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
TBP	TATA-binding Protein
Th	T-Helferzelle
TJ	<i>Tight Junctions</i>
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
Tnfa	muriner Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Wnt	Wingless-Int-1
WT	Wildtyp
+/-	heterozygot
-/-	homozygot

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1-1: Diskontinuierlich segmentale Entzündung aller Wandschichten bei MC im Vergleich zur von distal her kontinuierlich verlaufenden und auf das Kolon begrenzten Entzündung der luminalen Wandschichten bei der CU	5
Abbildung 1-2: Integrin-Aktivierung durch Kindlin und Talin	11
Abbildung 5-1: Genexpression von <i>IL8</i> , <i>Integrin beta1</i> , <i>Kindlin1</i> , <i>Kindlin2</i> , <i>Talin</i> und <i>Paxillin</i> im Kolon pädiatrischer CED-Patienten	41
Abbildung 5-2: Korrelationsanalyse mit linearer Regression der Genexpressionen von <i>Integrin beta1</i> , <i>Kindlin2</i> , <i>Talin</i> , <i>Paxillin</i> und <i>Kindlin1</i> versus <i>IL8</i> sowie <i>Kindlin1</i> versus <i>Kindlin2</i>	42
Abbildung 5-3: Vorversuch zur Messung der Genexpression von <i>Kindlin1</i> , <i>Kindlin2</i> , <i>IL8</i> , <i>Integrin beta1</i> , <i>Talin</i> und <i>Paxillin</i> in verschiedenen kolorektalen (Adeno)-Karzinomzelllinien	44
Abbildung 5-4: Genexpression von <i>Kindlin1</i> , <i>Kindlin2</i> , <i>IL8</i> , <i>Integrin beta1</i> , <i>Talin</i> und <i>Paxillin</i> in HT29 Zellen nach <i>Kindlin1</i> -Knockdown	45
Abbildung 6-1: Genexpression von <i>Kindlin1</i> , <i>Talin</i> , <i>Paxillin</i> und <i>Integrin beta1</i> in unbehandelten <i>Kindlin1</i> ^{+/-} -Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Tieren	46
Abbildung 6-2: Genexpression von <i>Tnfa</i> , <i>Ifng</i> , <i>Il1b</i> und <i>Il6</i> in unbehandelten <i>Kindlin1</i> ^{+/-} -Mäusen und unbehandelten Wildtyp-Tieren	47
Abbildung 6-3: Kaplan-Meier-Kurven zum Auftreten von okkultem Blut im Stuhl während DSS-Behandlung	48
Abbildung 6-4: Kaplan-Meier-Kurven zum Auftreten von sichtbar aufgelagertem Blut auf dem Stuhl oder im Afterbereich der Versuchstiere während DSS-Behandlung	48
Abbildung 6-5: Gewichtsveränderung nach DSS-Behandlung im Vergleich zum Ausgangsgewicht bei <i>Kindlin1</i> ^{+/-} -Mäusen und Wildtyp-Tieren	49
Abbildung 6-6: Vergleich der Kolonlänge von <i>Kindlin1</i> ^{+/-} -Mäusen und Wildtyp-Tieren mit und ohne DSS-induzierte Colitis	50
Abbildung 6-7: Repräsentative Darstellung der Hematoxilin-Eosin-Färbung vierer Kolonabschnitte von proximal nach distal einer DSS-Colitis-Maus	51
Abbildung 6-8: Histologische Veränderungen der Kryptenstruktur (links) und Mukosaintegrität in %	51
Abbildung 6-9: Repräsentative Darstellung der PAS-Reaktion vierer Kolonabschnitte, von proximal nach distal, einer von DSS-Colitis betroffenen Maus	52
Abbildung 6-10: Quantität und Verteilung der Becherzellen bei DSS-behandelten <i>Kindlin1</i> ^{+/-} -Tieren im Vergleich zu DSS-behandelten WT-Tieren	52
Abbildung 6-11: Proteinnachweis des Apoptosemarkers <i>cleaved-PARP</i> mittels <i>Western Blot</i>	53
Abbildung 6-12: Genexpression der Entzündungsmarker <i>Tnfa</i> , <i>Ifng</i> , <i>Il1b</i> und <i>Il6</i> im Rektum von <i>Kindlin1</i> ^{+/-} -Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach DSS-Behandlung sowie ohne Behandlung	54

Abbildung 6-13: Genexpression von <i>Kindlin1</i> , <i>Talin</i> , <i>Paxillin</i> und <i>Integrin beta1</i> im Rektum von <i>Kindlin1</i> ^{+/-} -Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach DSS-Behandlung sowie ohne Behandlung	55
Tabelle 1: Detaillierte Angaben über die Herkunft der Proben der Patientengruppe einschließlich Montreal-Klassifikation ausgewertet nach (BAUMGART 2009)	28
Tabelle 2: Angaben über die Herkunft der Proben der Kontrollgruppe	29
Tabelle 3: Mastermixzusammensetzung pro 0,6 µl Template für Genotypisierungs-PCR	33
Tabelle 4: PCR Programm zur Genotypisierung von <i>Kindlin1</i> -Mutationen	33
Tabelle 5: PCR-Programm zur quantitativen Bestimmung der Genexpressionsrate	36
Tabelle 6: Auswertungsschema zur Beurteilung der HE- und PAS-gefärbten Maus-Kolonquerschnitte	39

11 Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M., J. E. Heaysman, et al. (1971). "The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella." Exp Cell Res **67**(2): 359-67.
- Abrams, C. S. (2013). "Kindlin ignites a new flame." Blood **122**(14): 2297-8.
- Alex, P., N. C. Zachos, et al. (2009). "Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis." Inflamm Bowel Dis **15**(3): 341-52.
- Anand, R. J., C. L. Leaphart, et al. (2007). "The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis." Shock **27**(2): 124-33.
- Apley, J. and N. Naish (1958). "Recurrent abdominal pains: a field survey of 1,000 school children." Arch Dis Child **33**(168): 165-70.
- Araki, Y., K. Mukaisyo, et al. (2010). "Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice." Oncol Rep **24**(4): 869-74.
- Askari, J. A., C. J. Tynan, et al. (2010). "Focal adhesions are sites of integrin extension." J Cell Biol **188**(6): 891-903.
- Bandyopadhyay, A., G. Rothschild, et al. (2012). "Functional differences between kindlin-1 and kindlin-2 in keratinocytes." J Cell Sci **125**(Pt 9): 2172-84.
- Banno, A. and M. H. Ginsberg (2008). "Integrin activation." Biochem Soc Trans **36**(Pt 2): 229-34.
- Bartnik, W. (2003). "Inflammatory bowel disease--Polish contribution." J Physiol Pharmacol **54 Suppl 3**: 205-10.
- Baumgart, D. C. (2009). "The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis." Dtsch Arztebl Int **106**(8): 123-33.
- Behrens, R. (2006). "Chronisch entzündliche Darmerkrankungen des Kindes- und Jugendalters." UNI-MED-Verlag Bremen **2. Auflage**.
- Boirivant, M., I. J. Fuss, et al. (1998). "Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4." J Exp Med **188**(10): 1929-39.
- Bottcher, R. T., A. Lange, et al. (2009). "How ILK and kindlins cooperate to orchestrate integrin signaling." Curr Opin Cell Biol **21**(5): 670-5.
- Bousvaros, A., D. A. Antonioli, et al. (2007). "Differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America." J Pediatr Gastroenterol Nutr **44**(5): 653-74.

- Brant, S. R. (2011). "Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies." Inflamm Bowel Dis **17**(1): 1-5.
- Bruewer, M., S. Samarin, et al. (2006). "Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex." Ann N Y Acad Sci **1072**: 242-52.
- Budarf, M. L., C. Labbe, et al. (2009). "GWA studies: rewriting the story of IBD." Trends Genet **25**(3): 137-46.
- Campbell, I. D. and M. H. Ginsberg (2004). "The talin-tail interaction places integrin activation on FERM ground." Trends Biochem Sci **29**(8): 429-35.
- Castro-Sanchez, P. and J. M. Martin-Villa (2013). "Gut immune system and oral tolerance." Br J Nutr **109 Suppl 2**: S3-11.
- Chassaing, B., J. D. Aitken, et al. (2014). "Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice." Curr Protoc Immunol **104**: Unit 15 25.
- Claessen, M. M., M. E. Schipper, et al. (2010). "WNT-pathway activation in IBD-associated colorectal carcinogenesis: potential biomarkers for colonic surveillance." Cell Oncol **32**(4): 303-10.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." Cell **127**(3): 469-80.
- Cook-Mills, J. M. and T. L. Deem (2005). "Active participation of endothelial cells in inflammation." J Leukoc Biol **77**(4): 487-95.
- Corazziari, E. S. (2009). "Intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon." J Pediatr Gastroenterol Nutr **48 Suppl 2**: S54-5.
- Cornaggia, M., M. Leutner, et al. (2011). "Chronic idiopathic inflammatory bowel diseases: the histology report." Dig Liver Dis **43 Suppl 4**: S293-303.
- Crohn, B. B., L. Ginzburg, et al. (1984). "Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer." Jama **251**(1): 73-9.
- Duriez, P. J. and G. M. Shah (1997). "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death." Biochem Cell Biol **75**(4): 337-49.
- Egger, B., M. Bajaj-Elliott, et al. (2000). "Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency." Digestion **62**(4): 240-8.
- Fevr, T., S. Robine, et al. (2007). "Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells." Mol Cell Biol **27**(21): 7551-9.

- Fine, J. D., R. A. Eady, et al. (2008). "The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB." J Am Acad Dermatol **58**(6): 931-50.
- Fuchs, E., J. Dowling, et al. (1997). "Integrators of epidermal growth and differentiation: distinct functions for beta 1 and beta 4 integrins." Curr Opin Genet Dev **7**(5): 672-82.
- Geboes, K. and G. De Hertogh (2003). "Indeterminate colitis." Inflamm Bowel Dis **9**(5): 324-31.
- Gersemann, M., S. Becker, et al. (2009). "Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis." Differentiation **77**(1): 84-94.
- Glocker, E. O., N. Frede, et al. (2010). "Infant colitis--it's in the genes." Lancet **376**(9748): 1272.
- Glocker, E. O., D. Kotlarz, et al. (2009). "Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor." N Engl J Med **361**(21): 2033-45.
- Goult, B. T., M. Bouaouina, et al. (2009). "The structure of the N-terminus of kindlin-1: a domain important for α 5 β 3 integrin activation." J Mol Biol **394**(5): 944-56.
- Gryboski, J. D., R. Touloukian, et al. (1988). "Gastrointestinal manifestations of epidermolysis bullosa in children." Arch Dermatol **124**(5): 746-52.
- Halfvarson, J., L. Bodin, et al. (2003). "Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics." Gastroenterology **124**(7): 1767-73.
- Haller, D. (2012). "Der Darm als Grenzfläche zur Umwelt: Epithelzellen als Sensor und Signalgeber." Aktuel. Ernährungsmed. **37**.
- Halme, L., P. Paavola-Sakki, et al. (2006). "Family and twin studies in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **12**(23): 3668-72.
- Has, C., D. Castiglia, et al. (2011). "Kindler syndrome: extension of FERMT1 mutational spectrum and natural history." Hum Mutat **32**(11): 1204-12.
- Has, C., C. Herz, et al. (2009). "Kindlin-1 is required for RhoGTPase-mediated lamellipodia formation in keratinocytes." Am J Pathol **175**(4): 1442-52.
- Has, C., R. J. Ludwig, et al. (2008). "C-terminally truncated kindlin-1 leads to abnormal adhesion and migration of keratinocytes." Br J Dermatol **159**(5): 1192-6.
- He, Y., P. Esser, et al. (2011). "Role of kindlin-2 in fibroblast functions: implications for wound healing." J Invest Dermatol **131**(1): 245-56.
- Herz, C., M. Aumailley, et al. (2006). "Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes." J Biol Chem **281**(47): 36082-90.

- Hoffmann, K., Klump (2009). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.
- Hughes, B. R. and J. Horne (1988). "Epidermolysis bullosa acquisita and total ulcerative colitis." J R Soc Med **81**(8): 473-5.
- Hughes, P. E., F. Diaz-Gonzalez, et al. (1996). "Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling." J Biol Chem **271**(12): 6571-4.
- Hynes, R. O. (1987). "Integrins: a family of cell surface receptors." Cell **48**(4): 549-54.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-87.
- Irwin, R., T. Lee, et al. (2013). "Colitis-induced bone loss is gender dependent and associated with increased inflammation." Inflamm Bowel Dis **19**(8): 1586-97.
- Ithychanda, S. S., M. Das, et al. (2009). "Migfilin, a molecular switch in regulation of integrin activation." J Biol Chem **284**(7): 4713-22.
- Jager, S., E. F. Stange, et al. (2013). "Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease." Langenbecks Arch Surg **398**(1): 1-12.
- Jobard, F., B. Bouadjar, et al. (2003). "Identification of mutations in a new gene encoding a FERM family protein with a pleckstrin homology domain in Kindler syndrome." Hum Mol Genet **12**(8): 925-35.
- Jockusch, B. M., P. Bubeck, et al. (1995). "The molecular architecture of focal adhesions." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 379-416.
- Karakose, E., H. B. Schiller, et al. (2010). "The kindlins at a glance." J Cell Sci **123**(Pt 14): 2353-6.
- Kawai, K., C. Viars, et al. (2002). "Comprehensive karyotyping of the HT-29 colon adenocarcinoma cell line." Genes Chromosomes Cancer **34**(1): 1-8.
- Kelsen, J. and R. N. Baldassano (2008). "Inflammatory bowel disease: the difference between children and adults." Inflamm Bowel Dis **14 Suppl 2**: S9-11.
- Kern, J. S., C. Herz, et al. (2007). "Chronic colitis due to an epithelial barrier defect: the role of kindlin-1 isoforms." J Pathol **213**(4): 462-70.
- Kindler, T. (1954). "Congenital poikiloderma with traumatic bulla formation and progressive cutaneous atrophy." Br J Dermatol **66**(3): 104-11.
- Kloeker, S., M. B. Major, et al. (2004). "The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion." J Biol Chem **279**(8): 6824-33.

- Konsavage, W. M., Jr., G. Jin, et al. (2012). "The Myc 3' Wnt-responsive element regulates homeostasis and regeneration in the mouse intestinal tract." Mol Cell Biol **32**(19): 3891-902.
- Kucharzik, T., C. Maaser, et al. (2006). "Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies." Inflamm Bowel Dis **12**(11): 1068-83.
- Labeille, B., J. L. Gineston, et al. (1988). "Epidermolysis bullosa acquisita and Crohn's disease. A case report with immunological and electron microscopic studies." Arch Intern Med **148**(6): 1457-9.
- Lacher, M., R. Kappler, et al. (2007). "Association of a CXCL9 polymorphism with pediatric Crohn's disease." Biochem Biophys Res Commun **363**(3): 701-7.
- Lacher, M., S. Schroepf, et al. (2009). "Autophagy 16-like 1 rs2241880 G allele is associated with Crohn's disease in German children." Acta Paediatr **98**(11): 1835-40.
- Lacher, M., S. Schroepf, et al. (2010). "Association of the interleukin-23 receptor gene variant rs11209026 with Crohn's disease in German children." Acta Paediatr **99**(5): 727-33.
- Lai-Cheong, J. E. and J. A. McGrath (2010). "Kindler syndrome." Dermatol Clin **28**(1): 119-24.
- Lai-Cheong, J. E., M. Parsons, et al. (2009). "The role of kindlins in cell biology and relevance to human disease." Int J Biochem Cell Biol **42**(5): 595-603.
- Lai-Cheong, J. E., M. Parsons, et al. (2009). "Loss-of-function FERMT1 mutations in kindler syndrome implicate a role for fermitin family homolog-1 in integrin activation." Am J Pathol **175**(4): 1431-41.
- Lai-Cheong, J. E., A. Tanaka, et al. (2009). "Kindler syndrome: a focal adhesion genodermatosis." Br J Dermatol **160**(2): 233-42.
- Lai-Cheong, J. E., S. Ussar, et al. (2008). "Colocalization of kindlin-1, kindlin-2, and migfilin at keratinocyte focal adhesion and relevance to the pathophysiology of Kindler syndrome." J Invest Dermatol **128**(9): 2156-65.
- Lanschuetzer, C. M., W. H. Muss, et al. (2003). "Characteristic immunohistochemical and ultrastructural findings indicate that Kindler's syndrome is an apoptotic skin disorder." J Cutan Pathol **30**(9): 553-60.
- Larjava, H., E. F. Plow, et al. (2008). "Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion." EMBO Rep **9**(12): 1203-8.
- Laroui, H., S. A. Ingersoll, et al. (2012). "Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon." PLoS One **7**(3): e32084.

- Latella, G. and C. Papi (2012). "Crucial steps in the natural history of inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **18**(29): 3790-9.
- Laukoetter, M. G., P. Nava, et al. (2008). "Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**(3): 401-7.
- Lichtarowicz, A. M. and J. F. Mayberry (1988). "Antoni Lesniowski and his contribution to regional enteritis (Crohn's disease)." J R Soc Med **81**(8): 468-70.
- Liddington, R. C. and M. H. Ginsberg (2002). "Integrin activation takes shape." J Cell Biol **158**(5): 833-9.
- Lo, S. H. (2006). "Focal adhesions: what's new inside." Dev Biol **294**(2): 280-91.
- Lockhart-Mummery, H. E. and B. C. Morson (1960). "Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis." Gut **1**: 87-105.
- Loddo, I. and C. Romano (2015). "Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis." Front Immunol **6**: 551.
- Malinin, N. L., E. F. Plow, et al. (2010). "Kindlins in FERM adhesion." Blood **115**(20): 4011-7.
- McDole, J. R., L. W. Wheeler, et al. (2012). "Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine." Nature **483**(7389): 345-9.
- Meager, A. (1999). "Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation." Cytokine Growth Factor Rev **10**(1): 27-39.
- Meves, A., C. Stremmel, et al. (2009). "The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins." Trends Cell Biol **19**(10): 504-13.
- Molodecky, N. A., I. S. Soon, et al. (2012). "Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review." Gastroenterology **142**(1): 46-54 e42; quiz e30.
- Moran, C. J., T. D. Walters, et al. (2013). "IL-10R Polymorphisms Are Associated with Very-early-onset Ulcerative Colitis." Inflamm Bowel Dis **19**(1): 115-123.
- Moser, M., K. R. Legate, et al. (2009). "The tail of integrins, talin, and kindlins." Science **324**(5929): 895-9.
- Najdi, R., R. F. Holcombe, et al. (2011). "Wnt signaling and colon carcinogenesis: beyond APC." J Carcinog **10**: 5.
- Neutra, M. R., N. J. Mantis, et al. (2001). "Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues." Nat Immunol **2**(11): 1004-9.

- O'Toole, T. E., Y. Katagiri, et al. (1994). "Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction." J Cell Biol **124**(6): 1047-59.
- Okayasu, I., S. Hatakeyama, et al. (1990). "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice." Gastroenterology **98**(3): 694-702.
- Orholm, M., V. Binder, et al. (2000). "Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study." Scand J Gastroenterol **35**(10): 1075-81.
- Ow, C. K. and Y. K. Tay (2006). "What syndrome is this? Kindler syndrome." Pediatr Dermatol **23**(6): 586-8.
- Perse, M. and A. Cerar (2012). "Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks." J Biomed Biotechnol **2012**: 718617.
- Petit, V. and J. P. Thiery (2000). "Focal adhesions: structure and dynamics." Biol Cell **92**(7): 477-94.
- Petricca, G., M. Leppilampi, et al. (2009). "Localization and potential function of kindlin-1 in periodontal tissues." Eur J Oral Sci **117**(5): 518-27.
- Pullan, R. D., G. A. Thomas, et al. (1994). "Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis." Gut **35**(3): 353-9.
- Qin, J., O. Vinogradova, et al. (2004). "Integrin bidirectional signaling: a molecular view." PLoS Biol **2**(6): e169.
- Rogler, G. and T. Andus (1998). "Cytokines in inflammatory bowel disease." World J Surg **22**(4): 382-9.
- Rognoni, E., M. Widmaier, et al. (2014). "Kindlin-1 controls Wnt and TGF-beta availability to regulate cutaneous stem cell proliferation." Nat Med **20**(4): 350-9.
- Sadler, E., A. Klausegger, et al. (2006). "Novel KIND1 gene mutation in Kindler syndrome with severe gastrointestinal tract involvement." Arch Dermatol **142**(12): 1619-24.
- Schirbel, A. and C. Fiocchi (2010). "Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy." J Dig Dis **11**(5): 266-76.
- Schulzke, J. D., S. Ploeger, et al. (2009). "Epithelial tight junctions in intestinal inflammation." Ann N Y Acad Sci **1165**: 294-300.
- Schwartz, M. A., M. D. Schaller, et al. (1995). "Integrins: emerging paradigms of signal transduction." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 549-99.
- Schweinitz, D. v. (2009). Kinderchirurgie: viszerale und allgemeine Chirurgie des Kindesalters. Heidelberg, Springer.

- Shaoul, R., Y. Okada, et al. (2004). "Colonic expression of MUC2, MUC5AC, and TFF1 in inflammatory bowel disease in children." J Pediatr Gastroenterol Nutr **38**(5): 488-93.
- Shi, X., Y. Q. Ma, et al. (2007). "The MIG-2/integrin interaction strengthens cell-matrix adhesion and modulates cell motility." J Biol Chem **282**(28): 20455-66.
- Siegel, D. H., G. H. Ashton, et al. (2003). "Loss of kindlin-1, a human homolog of the *Caenorhabditis elegans* actin-extracellular-matrix linker protein UNC-112, causes Kindler syndrome." Am J Hum Genet **73**(1): 174-87.
- Smith, P. K., G. P. Davidson, et al. (1993). "Epidermolysis bullosa and severe ulcerative colitis in an infant." J Pediatr **122**(4): 600-3.
- Suraweera, N., J. Robinson, et al. (2006). "Mutations within Wnt pathway genes in sporadic colorectal cancers and cell lines." Int J Cancer **119**(8): 1837-42.
- Tanaka, T., H. Kohno, et al. (2003). "A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate." Cancer Sci **94**(11): 965-73.
- Techanukul, T., G. Sethuraman, et al. (2011). "Novel and recurrent FERMT1 gene mutations in Kindler syndrome." Acta Derm Venereol **91**(3): 267-70.
- Tu, Y., S. Wu, et al. (2003). "Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation." Cell **113**(1): 37-47.
- Turner, C. E. (2000). "Paxillin and focal adhesion signalling." Nat Cell Biol **2**(12): E231-6.
- Ussar, S., M. Moser, et al. (2008). "Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction." PLoS Genet **4**(12): e1000289.
- Ussar, S., H. V. Wang, et al. (2006). "The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development." Exp Cell Res **312**(16): 3142-51.
- van Dekken, H., J. C. Wink, et al. (2007). "Wnt pathway-related gene expression during malignant progression in ulcerative colitis." Acta Histochem **109**(4): 266-72.
- Weinstein, E. J., M. Bournier, et al. (2003). "URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas." Biochim Biophys Acta **1637**(3): 207-16.
- Wick, M., C. Burger, et al. (1994). "Identification of serum-inducible genes: different patterns of gene regulation during G0-->S and G1-->S progression." J Cell Sci **107** (Pt 3): preceding table of contents.
- Wilks, S. (1859). "The morbid appearance of the intestine of Miss Banks." The Medical Times and Gazette **2**.

-
- Wirtz, S., C. Neufert, et al. (2007). "Chemically induced mouse models of intestinal inflammation." Nat Protoc **2**(3): 541-6.
- Wu, C. (2005). "Migfilin and its binding partners: from cell biology to human diseases." J Cell Sci **118**(Pt 4): 659-64.
- Yan, Y., V. Kolachala, et al. (2009). "Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis." PLoS One **4**(6): e6073.
- Zhang, Y., Y. Tu, et al. (2006). "Migfilin interacts with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) and regulates VASP localization to cell-matrix adhesions and migration." J Biol Chem **281**(18): 12397-407.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Johanna Althans (geb. Helmbrecht)
geboren am 20.02.1982 in Regensburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufspraxis / Promotion

01/2017 – heute	Mutterschutz und Elternzeit
02/2015 – 01/2017 01/2016 – 11/2016	Ernährungstherapeutin im Therapienetz Essstörung GmbH (Teilzeit) Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspitals (LMU) (Teilzeit)
11/2013 – 01/2015	Mutterschutz und Elternzeit
09/2011 – 11/2013	Ernährungstherapeutin in der Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie (LMU) (Teilzeit) Ernährungstherapeutin im Therapienetz Essstörung e.V. (Teilzeit)
02/2009 – 02/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Kinderchirurgischen Forschungslabor (AG Dr. Kappler) der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München Promotion zum Doktor der Humanbiologie (Dr. rer. biol. hum.) Thema: Die Rolle von <i>Kindlin1</i> bei der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen im Kindesalter
09/2001 – 08/2002	Freiwilliges soziales Jahr an der Bayerischen Landesschule für Körperbehinderte München

Bildungsweg

10/2002 – 01/2009	Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Abschluss: Diplom Ernährungswissenschaftlerin (Note 1,4)
05/2007 – 11/2008	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie Thema: Modulation der Genexpression von <i>SOD2</i> , <i>COX-2</i> und <i>GSTT2</i> in HT29- und LT97-Zellen durch Inkubation mit Docosahexaensäure und Eicosapentaensäure sowie Verifizierung auf funktioneller und Proteinebene (Note 1,7)
08/2006 - 02/2007	Auslandssemester an der Lunds Universität , Schweden
09/1992 - 07/2001	Mathematisch-naturwissenschaftliches und Neusprachliches Gymnasium Parsberg ; Abschluss: Abitur (Note 2,1)

Publikationen

Lacher M, Schroepf S, **Helmbrecht J**, von Schweinitz D, Ballauff A, Koch I, Lohse P, Osterrieder S, Kappler R, Koletzko S. (2010) Association of the interleukin-23 receptor gene variant rs11209026 with Crohn's disease in German children. *Acta Paediatr.*

Schroepf S, Kappler R, Brand S, Prell C, Lohse P, Glas J, Hoster E, **Helmbrecht J**, Ballauff A, Berger M, von Schweinitz D, Koletzko S, Lacher M. (2010) Strong overexpression of CXCR3 axis components in childhood inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.*

Lacher M, Fitze G, **Helmbrecht J**, Schroepf S, Berger M, Lohse P, Koletzko S, Ballauff A, Grote V, Goedeke J, von Schweinitz D, Kappler R. (2010) Hirschsprung-associated enterocolitis develops independently of NOD2 variants. *J Pediatr Surg.*

Lacher M, **Helmbrecht J**, Schroepf S, Koletzko S, Ballauff A, Classen M, Uhlig H, Hubertus J, Hartl D, Lohse P, von Schweinitz D, Kappler R. (2010) NOD2 mutations predict the risk for surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *J Pediatr Surg.*

Weidlich S, Bulau AM, Schwerdt T, **Althans J**, Kappler R, Koletzko S, Mayr D, Buffler P. (2014) Intestinal expression of the anti-inflammatory interleukin1 homologue IL-37 in pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*

14 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all jenen bedanken, ohne die das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt hierbei zunächst Herrn Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz, Direktor der Kinderchirurgischen Klinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in den Kinderchirurgischen Forschungslaboratorien anfertigen zu können.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Roland Kappler für die sehr kompetente Betreuung, die konstruktive Kritik und die hilfreichen Diskussionen. Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Martin Lacher für seine hilfreiche Betreuung und sehr konstruktive Kritik bedanken.

Dem ganzen (auch ehemaligen) Team der AG-Kappler, besonders Shiva Promoli, Rudolf Lehner, Saskia Joppien, Sarah Meier, Bente Hennigsen, Dr. Ferdinand Wagner und Christiane Zeller, danke ich für ihre Unterstützung, eine großartige Zeit und die schöne Zusammenarbeit. Ein ganz besonderer Dank geht hier an Dr. Beate Hagl, die mir stets geduldig und kompetent zur Seite stand und so eine riesengroße Hilfe war.

Mein herzlicher Dank gilt Sebastian Althans für seine unermüdliche Unterstützung, seine Geduld und sein Vertrauen in mich, Paulina und Luisa Althans, die auf ihre Weise viel zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben, meinen Eltern Gabriele und Peter Helmbrecht für ihre immerwährende Hilfe und Unterstützung sowie Barbara Gmelin für ihren unerschütterlichen Optimismus.

Eidesstattliche Versicherung

Althans, Johanna

Althans, Johanna

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Die Rolle von *Kindlin1* bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Kindesalter

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 2.11.2018

Ort, Datum

Johanna Althans

Unterschrift Doktorandin